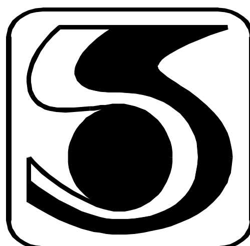
VISIT…

LANZAROTE Caliente.com

Научно-технологическая компания

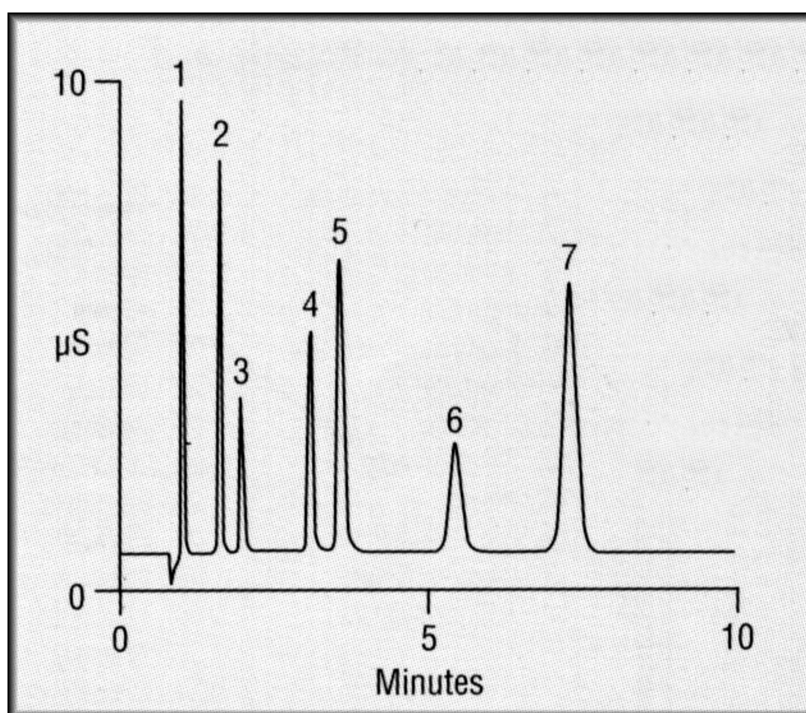
СИНТЕКО

Орлов В.И. Аратсков А.А.



ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ



Дзержинск 1997

I. ВВЕДЕНИЕ

Аналитическое применение хроматографии.

Хроматография - это один из методов пробоподготовки. При анализе сложных смесей для уверенного определения количества интересующего компонента практически всегда необходима подготовка пробы к анализу: экстракция, кристаллизация, выпаривание, соосаждение и т.д. Один из методов такой подготовки пробы является процесс хроматографирования, т.е. разделения сложной смеси на составляющие компоненты.

Накопленный опыт позволяет утверждать, что при анализе сложных объектов нельзя пренебрегать практически ни одним из компонентов:

- при экологических исследованиях установлено, что токсичное действие малых концентраций тяжелых металлов значительно выше, чем действие значительных концентраций NO_2, SO_2 и т.д.;
- при биологических исследованиях выясняют мощное влияние малых концентраций витаминов, антибиотиков, других лекарственных препаратов;
- при анализе пищевых продуктов на фоне большого содержания белков, жиров, углеводов весьма важно определение токсинов, минеральных веществ;
- качество выпускаемой продукции в значительной степени определяется наличием или, наоборот, отсутствием различных добавок, находящихся в малых концентрациях.

Эти примеры можно умножить.

Из сказанного можно сделать вполне определенный вывод: в настоящее время требуется детальный химический анализ разнообразных смесей и биологических объектов. Решение этой задачи невозможно без применения достаточно эффективных методов разделения сложных смесей. Среди таких методов доминирует хроматография. Бурно развиваясь в последнее десятилетие, этот метод открыл возможность разделения смесей, содержащих десятки и сотни компонентов, их количественный и качественный анализ, препаративное выделение индивидуальных веществ. Принципы хроматографии весьма универсальны, благодаря чему она оказалась пригодной для изучения объектов самой разной природы, от нефти и газов атмосферы до белков и даже вирусов.

Период, наступивший в аналитической химии органических соединений с начала 60-х годов без преувеличения может быть назван эпохой хроматографии. Один из вариантов этого метода - колоночная жидкостная хроматография, был создан русским ботаником Цветом М.С. (откуда название хроматографов “Цвет”) в 1903г. На протяжении последующих сорока лет хроматография не находила широкого практического применения. Лишь после 1950г. приходит время признания хроматографии. В 1952г. были выполнены первые работы по жидкостной хроматографии, а вскоре освоен выпуск газовых хроматографов, и в течение последующих 20 лет газохроматографический анализ стал основным методом исследования летучих термически устойчивых соединений. Но большинство органических соединений не обладает необходимой для газовой хроматографии летучестью и термостойкостью, и хроматографировать их можно только в более мягких условиях, характерных для жидкостной колоночной хроматографии. Скорость же и эффективность разделения, а также чувствительность анализа по этому методу долго оставались неудовлетворительными. И лишь в 1965-75 гг. были в принципе решены основные научные и технологические проблемы, сдерживавшие развитие метода. Последовавший затем прогресс был столь поразителен, что современная инструментальная разновидность метода получила самостоятельное наименование - высокоэффективная жидкостная хроматография. Важнейшим катализатором развития хроматографической науки и практики были потребности разных химических и естественных наук, начиная от медицины и кончая криминалистикой , не говоря уже о науках химических и био

логических. Внедрение хроматографических методов в эти области радикальным образом изменило тактику и методику исследований, обеспечило новые возможности контроля производства (до 200 хроматографов на 1 предприятии). Хроматографическое оборудование сейчас можно увидеть и в химической лаборатории, и в цехе, и в больнице, и в кабине корабля.

Можно утверждать, что внедрение хроматографии прививает современному химику новый взгляд на вещества и смеси, которые он исследует. Оказывается, ни одно вещество не такое чистое, каким кажется, и не одна смесь не такая простая , какой кажется, пока досконально не изучены хроматографическими методами. В справедливости этого исследовательского тезиса убежден, наверное, каждый в чью работу хроматография вошла прочно. Но пессимизм здесь только в форме, а не в содержании, так как обнаружение в смеси с помощью хроматографии новых компонентов или примесей может обернуться ценным научным результатом или, по меньшей мере, предотвратить ошибочные решения и выводы.

Итак, хроматография - это:

а) ряд теоретических представлений, посвященных законам сорбции и массопередачи;

б) материальный фундамент - приборы и сорбенты;

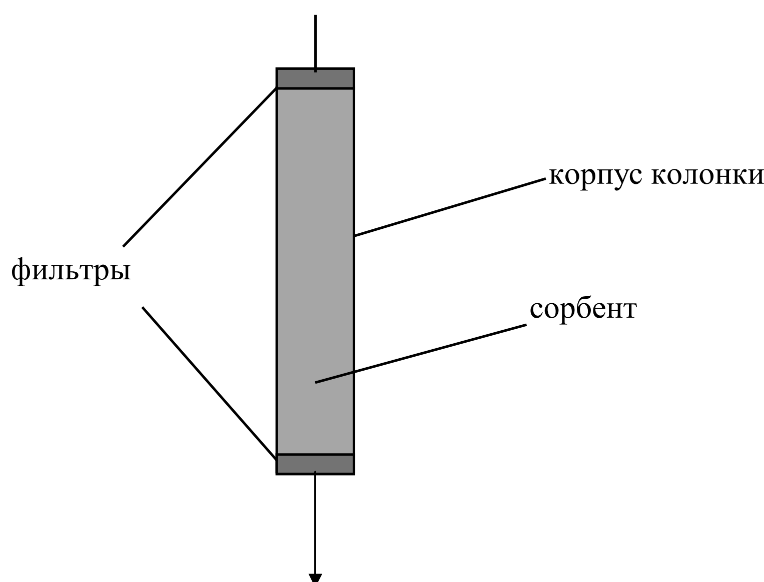
в) методологические и прикладные исследования, приводящие к созданию конкретных методик.

II. ПРИНЦИПЫ И ОСНОВЫ ТЕОРИИ ХРОМАТОГРАФИИ.

2.1. Хроматографический процесс: удерживание, размывание, разделение.

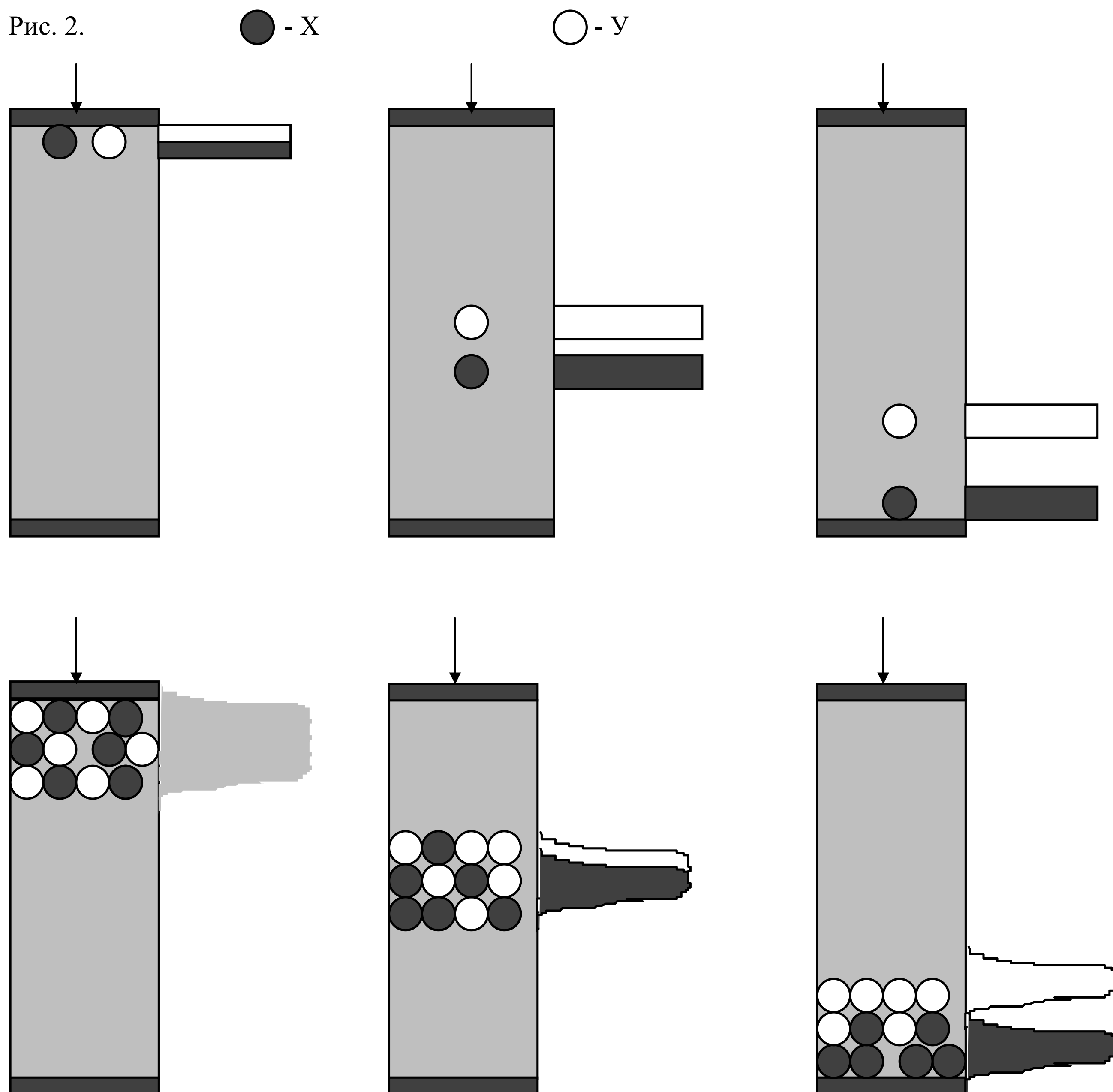
Основные элементы хроматографического процесса рассмотрим на примере разделения бинарной смеси в условиях колоночной жидкостной адсорбционной хроматографии. Представим себе трубку, заполненную простым адсорбентом (колонку), через которую непрерывно течет растворитель (рис. 1.)

Рис 1 Хроматографическая колонка



Адсорбент (сорбент, наполнитель колонки) удерживается в колонке фильтрами, он неподвижен и поэтому называется *неподвижной фазой*. Растворитель, перемещающийся относительно сорбента, называется *подвижной фазой* (в некоторых случаях *элюентом*). Вве-

дем в верхнюю часть колонки по одной молекуле соединений - *сорбатов*, обозначенных далее X и У (рис. 2). При движении вдоль колонки эти молекулы будут диффундировать внутри пор сорбента и, в результате межмолекулярных взаимодействий того или иного типа, адсорбироваться на поверхности неподвижной фазы.



Время, в течение которого молекулы находятся в адсорбированном состоянии, определяется силой межмолекулярного взаимодействия сорбатов X и У с сорбентом. При очень слабой сорбции молекулы почти все время проводят в растворе подвижной фазы и поэтому перемещаются вниз по колонке со скоростью, лишь незначительно уступающей скорости движения подвижной фазы. Наоборот, при очень сильной сорбции молекулы X и У почти не отрываются от поверхности и скорость их перемещения по колонке незначительна.

С точки зрения хроматографии нас больше всего интересуют такие условия, в которых сила адсорбции промежуточная и скорость перемещения X и У по колонке в 2-10 раз

меньше скорости движения подвижной фазы. Явление замедленного движения молекул Х и У относительно движения подвижной фазы в хроматографии называется *удерживанием*. Если константы сорбции веществ Х и У различны, то различным будет и их средняя скорость движения по колонке. Молекулы Х в нашем примере сорбируются слабее, при движении по колонке обгоняют молекулы У и из колонки они выйдут в разные моменты времени. Таким образом, достигается основная цель хроматографии - *разделение*.

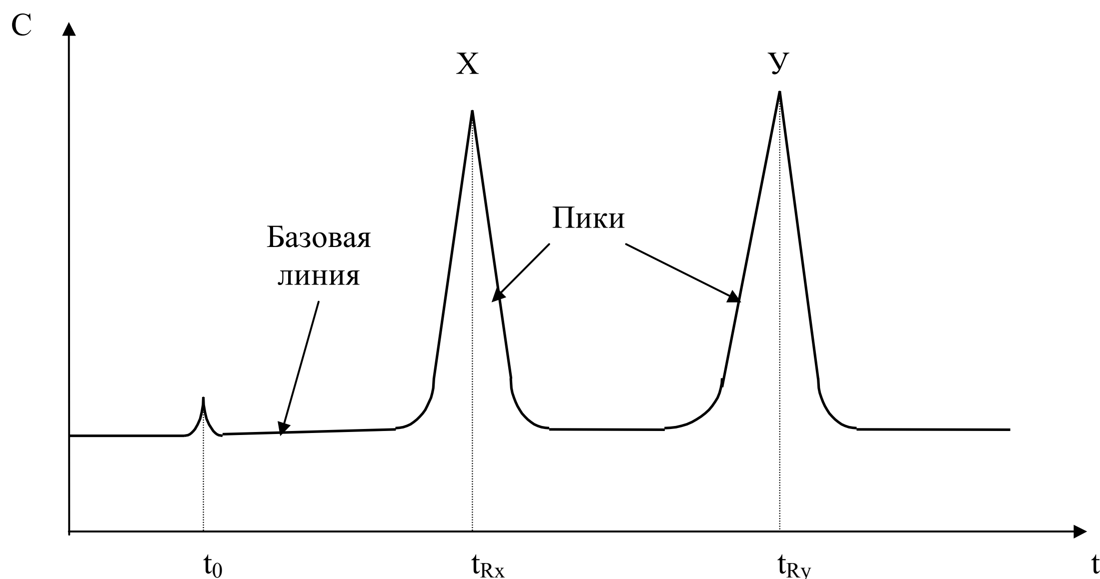
Естественно, что на практике в колонку не вводят единичные молекулы и поэтому данная картинка предельно упрощает реальную ситуацию. Если в колонку введены хотя бы несколько молекул разного вида, то обнаружим, что средние скорости перемещения молекул Х и У по-прежнему различны. Помимо этого, скорости перемещения отдельных молекул каждого вида отклоняются в ту или иную сторону от среднего для данного вида значения. Молекулы сорбатов , первоначально введенные в колонку в виде мгновенного импульса, выходят из нее более широкой зоной. Такая неидентичность скоростей перемещения одинаковых молекул в хроматографии называется *размыванием*. Оно связано с рядом явлений в колонке, которые подробнее рассмотрим позднее. Это нежелательное явление приводит к тому, что среди молекул У могут находиться также молекулы Х, скорость которых близка к скорости наиболее “быстрых” молекул У. В результате зоны Х и У могут частично наложиться одна на другую и разделение окажется неполным.

Процессы удерживания и размывания - предмет теории хроматографии

2.2. Некоторые основные термины и определения.

Хроматограмма - кривая, изображающая зависимость концентрации соединений, выходящих из колонки с потоком подвижной фазы, от времени с момента начала разделения (рис. 3).

Рис 3.



Хроматограмма обычно состоит из базовой линии и пиков. В хроматографических приборах, как правило, не происходит непосредственного измерения концентрации вещества в подвижной фазе, а с помощью специального узла - детектора измеряется какая-либо физическая величина, функционально связанная с концентрацией (электропроводность, оптическая плотность и т.д.).

Базовая линия соответствует тому промежутку времени, в течение которого детектор регистрирует сигнал только от подвижной фазы.

Пик - кривая, в идеале приближающаяся к кривой гауссова распределения, описывает постепенное нарастание концентрации на выходе из колонки и последующем ее уменьшении.

Время появления максимума пика на хроматограмме называется *временем удерживания* t_R.

При постоянных условиях работы и составе фаз хроматографической системы время удерживания является величиной постоянной для данного вещества. Иногда в начальной части хроматограммы регистрируется пик, природа которого связана с кратковременным нарушением равновесия в колонке при вводе пробы. Этому пику соответствует *время удерживания несорбируемого вещества* t_0.

Время удерживания также определяется скоростью подачи через колонку подвижной фазы F. *Удерживаемый объем* данного вещества рассчитывается по формуле:

$$V_n = t_n \cdot F \qquad (1)$$

и не зависит для данной колонки от расхода.

Параметр *коэффициент емкости* данного соединения в данной хроматографической системе рассчитывается по формуле:

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \qquad (2)$$

Этот параметр не зависит от размеров колонки и скорости потока и широко используется в хроматографической литературе и работах.

Сравнительную термодинамическую характеристику двух разделяемых пиков веществ дает *относительное удерживание*

$$\alpha_{i,j} = \frac{t_{Ri} - t_0}{t_{Rj} - t_0} \qquad (3)$$

или *селективность*. Эта величина показывает способность данной хроматографической системы разделять данную пару веществ i,j.

Времена удерживания и все производные от них величины являются по существу термодинамическими характеристиками процесса. Однако, в хроматографии (как в любом химическом процессе) результат определяется совместным влиянием факторов термодинамического и кинетического типа. Если в хроматографической системе данного состава при данной температуре у двух веществ значения t_R одинаковы (или α=1.0), то никакое изменение геометрии колонки не приведет к разделению этой пары. Но, с другой стороны, различие значений t_R вовсе не означает автоматически, что разделение, а тем более хорошее, будет достигнуто. Для этого используемая колонка должна обладать достаточно высокими кинетическими характеристиками. Акты сорбции-десорбции должны совершаться с большой скоростью, чтобы реализовать потенциальную возможность разделения, на которую указывает различие в t_R.

Основная кинетическая характеристика процесса - *высота h, эквивалентная теоретической тарелке* (ВЭТТ). Эта величина соответствует высоте слоя сорбента, при прохождении которого акт сорбции-десорбции совершается в среднем один раз. Она отражает, по существу, качество используемого сорбента, качество заполнения колонки и правильность выбора режима хроматографирования. Для оценки качества колонки применяется обратная величина - *число теоретических тарелок* N:

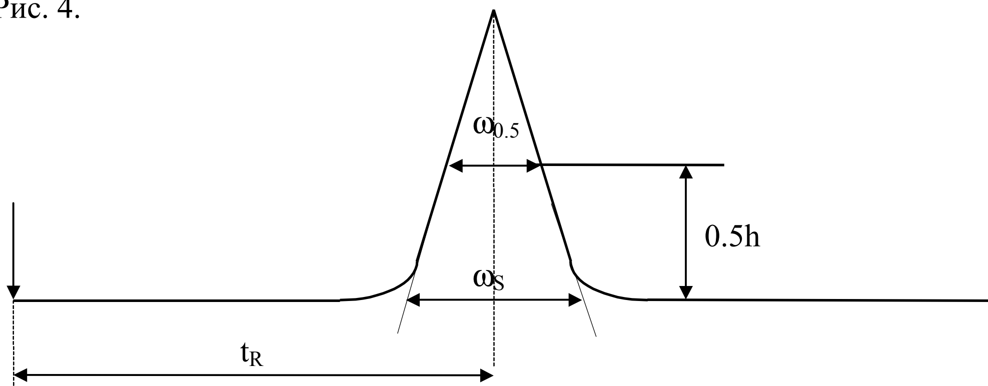
$$N = L/h \qquad (4)$$

где L - длина колонки, мм;
h - ВЭТТ, мм.

Число теоретических тарелок служит мерой *эффективности* колонки. Его рассчитывают по формуле:

$$N = 5{,}54 \cdot \left(\frac{t_R}{\omega_{0/5}}\right)^2 = 16\left(\frac{t_R}{\omega_S}\right)^2 \qquad (5)$$

Рис. 4.



В качестве численной меры степени разделения используется *критерий разделения* R_S. Он может быть рассчитан на основании измерения хроматограммы веществ X и У.

$$R_S = \frac{2\left(t_{Ry} - t_{Rx}\right)}{\omega_{Sy} + \omega_{Sx}} \qquad (6)$$

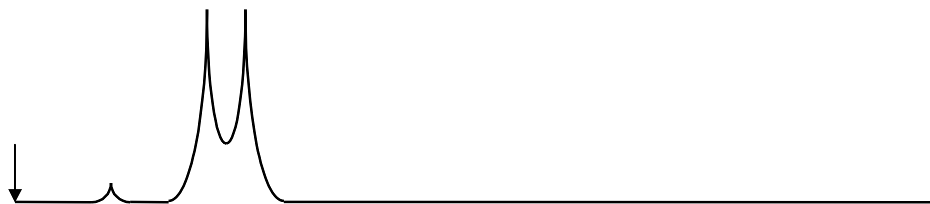
R_S связан с основными характеристиками системы следующим соотношением:

(7)

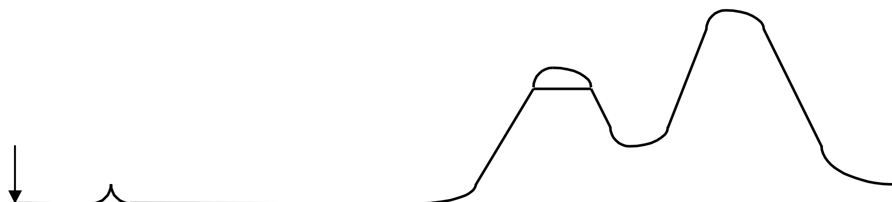
Совместное влияние селективности, удерживания и эффективности на результат разделения можно проиллюстрировать наглядно (рис. 5).

Рис. 5

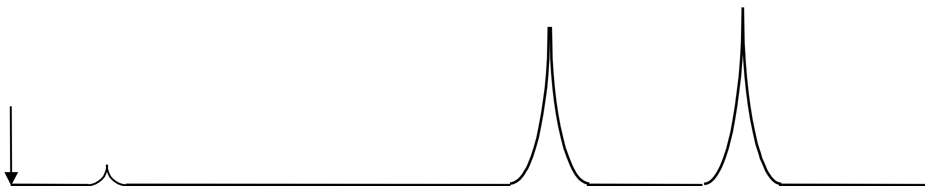
$\alpha = 0.8$
N = 10000
K' = 0.3
$R_S = 0.7$



$\alpha = 0.8$
N = 100
K' = 5
$R_S = 0.9$



$\alpha = 0.8$
N = 10000
K' = 5
$R_S = 9.2$



$\alpha = 0.99$
N = 20000
K' = 5
$R_S = 1.1$



2.3. Размывание хроматографических зон.

Разделяемая смесь вводится в колонку в виде узкого импульса и его объемом по сравнению с объемом колонки можно пренебречь. По мере перемещения молекул разделяемых веществ с потоком подвижной фазы импульс постепенно расширяется, при этом концентрация разделяемых веществ в нем уменьшается. Главная причина данного процесса в том, что скорость перемещения по колонке отдельных молекул отличается от средней скорости, характерной для данного соединения. С точки зрения конечного полезного результата хроматографического процесса - достижения разделения молекул различных видов - размывание зон крайне нежелательно, по крайней мере по следующим причинам. Во первых, интенсивное размывание ведет к частичному перекрыванию зон различных соединений и поэтому приходится предъявлять более жесткие требования к селективности системы. Причем даже если в том или ином случае удается обеспечить повышенную селективность, общая разделяющая способность невелика. Другое отрицательное следствие размывания - уменьшение концентрации сорбата в центре зоны, ведущее к снижению чувствительности при анализе.

Мерой интенсивности процессов размывания является высота, эквивалентная теоретической тарелке. Величина h определяется рядом частных процессов.

1) Неоднородность потока подвижной фазы. Сорбент в колонке образует систему каналов, через которые протекает подвижная фаза. Чем мельче частицы сорбента, тем ближе друг к другу длина пути молекул подвижной фазы, меньше разница времени проходящих через колонку молекул одной зоны, меньше размывание зоны.

$$h = 2\lambda d_p \qquad (8)$$

где d_p - размер частиц сорбента.

2) Молекулярная диффузия в подвижной и неподвижной фазах. Чем больше скорость потока, тем меньше размывание из-за этой причины.

$$h \approx 1/U \qquad (9)$$

где U - скорость потока.

3) Скорость массообмена - время сорбции или ионного обмена. Чем больше скорость потока, тем больше размывание из-за этой причины.

$$h \approx K \cdot U \qquad (10)$$

В конечном итоге получаем уравнение Ван-Деемтера.

$$h = A + \frac{B}{U} + CU \qquad (11)$$

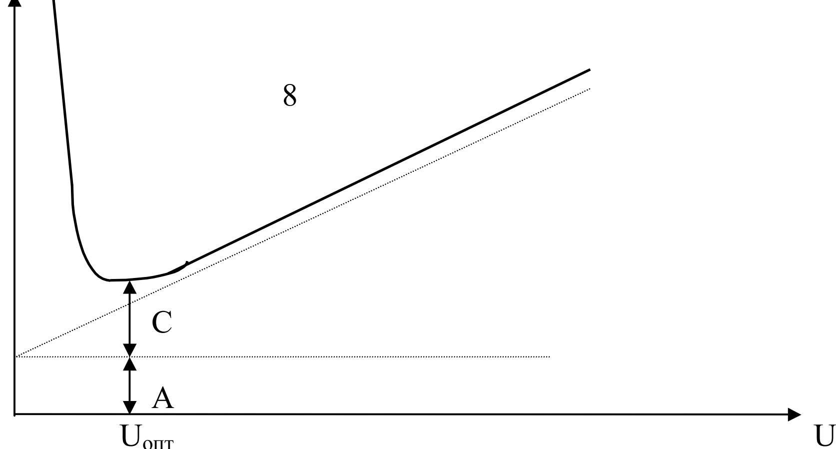
A - вклад неоднородности потока подвижной фазы;

B/U - вклад слагаемых диффузного характера;

CU - вклад кинетики массообмена.

Рис. 6

h



Ясно, что для снижения h необходимо использовать частицы сорбента меньшего диаметра. К сожалению, использовать этот путь можно лишь до определенного предела, который диктуется техническими соображениями.

Перепад давления в колонке связан с другими параметрами процесса следующим соотношением:

$$\Delta p = \frac{r \cdot U}{d_{\hat{A}}^2} \cdot L \qquad (12)$$

где r - параметр сопротивления потоку,

Δp - перепад давления,

U - скорость потока,

L - длина колонки.

При повышенном давлении резко возрастает стоимость и сложность оборудования. Поэтому в ЖХ d_p= 3-10 мкм, в ГХ - 100-200мкм. Для повышения эффективности предпочтительнее менее вязкие растворители, так как в них больше коэффициент диффузии и меньше сопротивление колонки.

Ш КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

С точки зрения агрегатного состояния подвижной фазы хроматографию разделяют на газовую и жидкостную; в первом случае подвижная фаза газообразная, во втором - жидкость. В дальнейшем мы будем рассматривать только жидкостную хроматографию в ее различных вариантах.

Т.к. хроматография представляет собой физико-химический процесс, наиболее естественным была бы классификация жидкостной хроматографии на несколько методов, положив в основу классификации принцип деления смеси на компоненты.

С этой точки зрения ЖХ можно разделить на 3 класса:

- адсорбционную;
- ионообменную;
- гельпроникающую.
-

3.1. Адсорбционная хроматография.

В основе разделения методами адсорбционной жидкостной хроматографии лежит адсорбция - физическое взаимодействие между молекулами пробы (сорбата) и сорбента, а также между молекулами элюента и сорбента.

Типичные физическое взаимодействие - это взаимодействие, обусловленное дисперсионными и электростатическими силами (диполь-дипольные и ион-дипольные взаимодействия, образование водородных связей). Дисперсионные взаимодействия имеют неполярную природу, их физический смысл объясняется с позиций квантовой механики. Диполь-дипольные взаимодействия, называемые обычно ориентационными, могут происходить

лишь между молекулами, обладающими постоянным дипольным моментом. Очень важный в хроматографии тип полярного взаимодействия - образование водородных связей. Эти взаимодействия достаточно сильны и приближаются по силе к энергии слабой химической связи.

Все взаимодействия физического типа обычно проходят с большой скоростью и сам процесс адсорбции в ЖАХ не является лимитирующей стадией в массообмене.

Подавляющая часть органических соединений разделяется методами адсорбционной жидкостной хроматографии. Разделяемые вещества находятся в виде молекул, поэтому этот метод часто называют молекулярной жидкостной хроматографией.

Что можно анализировать этим методом?

1) В нефти

- насыщенные углеводороды
- алкилбензолы
- алкилнафталины
- ароматические многоядерные углеводороды (антрацен и т.д.)
- полярные ароматические (фенолы и т.д.)
- гетероциклы (тиофены, бензтиофены и т.д.)

2) Липиды

- сахара
- холестерины
- моно и диглицериды
- жирные кислоты

3) Гормоны

4) ПАВ

5) Пищевые добавки (красители, стабилизаторы и т.д.)

6) Витамины.

Адсорбционную хроматографию можно разделить на 2 вида.

1. Хроматография на полярном сорбенте (SiO_2, Al_2O_3) с неполярным элюентом (гексан, гептан с добавкой 1-2% спирта). Хорошо разделяются неполярные соединения (бензол, насыщенные углеводороды, ароматика). Элюент должен быть обезвожен, чтоб H_2O не закрывала активные центры SiO_2. Метод еще называется "нормально-фазовым".

Твердая поверхность адсорбента покрыта молекулами растворителя, довольно слабо взаимодействующими с сорбентом. Адсорбция пробы требует десорбции части молекул растворителя, чтобы проба могла достичь поверхности сорбента. Таким образом процесс адсорбции носит конкурентный характер.

2. Второй вид - хроматография на неполярном сорбенте с использованием полярных элюентов (спирты, ацетонитрил, ацетон). Другое название этого метода "обращенно-фазовая хроматография". Неполярный сорбент готовят из обычного силикагеля, привив на его поверхность углеводородные соединения, чаще всего длина углеводородной цепочки C=2, 8, 16 и 18. На таком неполярном сорбенте хорошо разделяются полярные вещества (спирты, витамины, наркотики, антидепрессанты и т.д.). В настоящее время основная масса разделений в жидкостной хроматографии (до 80%) проводится с использованием этого метода. При прививке на поверхность сорбента групп типа NH_2 (амины), CN - нитрил, C_6H_5-фенил селективность разделения можно изменить по сравнению с SilC-18 и тем самым улучшить разделение интересующих нас соединений.

3.2. Ионообменная хроматография.

В основе разделения лежит обратимый обмен ионов между неподвижной ионообменной и жидкой подвижной фазой. Различие в сродстве ионов образца к ионообменной неподвижной фазе приводит к разделению. Это уже процесс химического, а не физического взаимодействия ионов.

В качестве сорбентов используется силикагель или полимер с привитыми группами:


$N^+(CH_3)_3Cl^-$ или $N^+(CH_3)_3OH^-$

для разделения анионов (обмениваются Cl^- или OH^- на анализируемые анионы F^-, Cl^-, NO_3^-, SO_4^-, PO_4^- и т.д.)

$SO_3^-H^+$ - для разделения катионов (обычно металлов) Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+} и т.д. Обмениваемый ион - H^+.

Силикагель применяется редко, так как смола должна быть устойчива в кислой и щелочной среде, где силикагель не стоек, а условия разделения оптимальны.

Основное применение ИОХ:

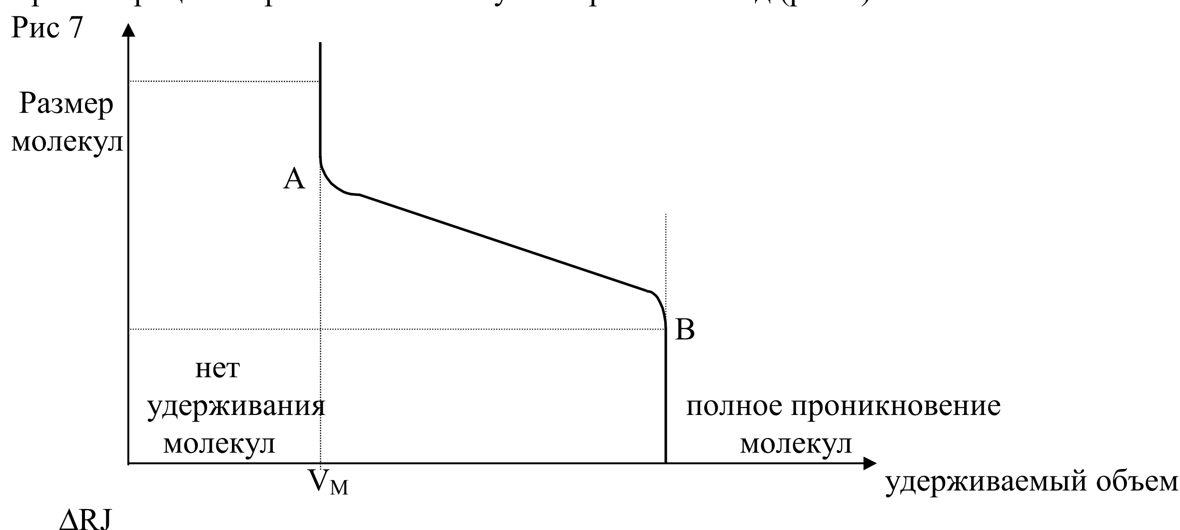
- анализ анионов в технологии и экологии;
- анализ металлов в технологии, воде, окружающей среде;
- ядерная физика, анализ белков и нуклеиновых кислот.

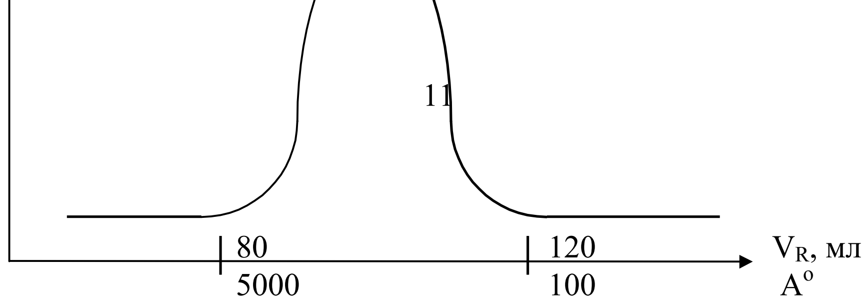
3.3. Гель-проникающая хроматография.

Основная область применения гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии - анализ полимеров по молекулярному весу молекул. Известно, что полимер - длинноцепочечные молекулы, состоящие из разного числа одинаковых фрагментов. Чем ближе размеры молекул друг к другу, тем однороднее полимер, тем выше его качество. Относительное количество молекул каждой молекулярной массы представляет собой важную характеристику - молекулярно-массовое распределение полимера. Получить эту характеристику можно с помощью гель проникающей хроматографии.

Принцип разделения состоит в следующем: молекулы пробы проникают внутрь заполненных растворителем пор сорбента и задерживаются там на разное время. Если молекула имеет очень большой размер, то она вообще не проникает в поры и проскакивает через колонку не удерживаясь. Поры сорбента имеют разброс по размерам. Более мелкие молекулы пробы задерживаются в части пор, потом вымываются из них растворителем. Они через колонку пройдут медленнее, чем первые. Еще более мелкие частицы еще дольше будут проходить через колонку, так как количество доступных для них пор еще больше. Дольше всех проходят через колонку самые мелкие частицы (растворитель).

Таким образом обеспечивается разделение частиц (молекул) по размерам. Калибровочная кривая процесса протекания молекул в поры имеет вид (рис 7).





Сорбенты: стекла (макропористые), силикагель, полистирол.
Детектор: RJ. Больше колонка - лучше разделение.

IV. СОРБЕНТЫ.

Становление ВЭЖХ в значительной мере связано с созданием новых поколений сорбентов с хорошими кинетическими свойствами и разнообразными термодинамическими свойствами.

Основной материал для сорбентов в ЖАХ - силикагель. Он механически прочен, обладает значительной пористостью, что дает большую обменную емкость при небольших размерах колонки. Наиболее ходовой размер частиц 5-10 мкм. Чем ближе к шарообразной форма частиц, тем меньше сопротивление потоку, выше эффективность, особенно, если отсеяна очень узкая фракция (например 7±1мкм). Удельная поверхность силикагеля 10-600 $м^2/г$.

Силикагель может быть модифицирован различными химическими группами, привитыми к поверхности (С-18, CN, NH_2, SO_3H), что позволяет использовать сорбенты на его основе для разделения самых различных классов соединений.

Основной недостаток силикагеля - малая химическая стойкость при $pH<2$ и $pH>9$ (кремнезем растворяется в щелочах и кислотах). Поэтому в настоящее время идет интенсивный поиск сорбентов на базе полимеров, стойких при pH от 1 до 14, например, на основе полиметилметакрилата, полистирола и т.д. (в Чехии, США, Германии).

Сорбенты для ионообменной хроматографии.

В силу особенностей разделения (в кислой или щелочной среде) основной материал сорбентов - полистирол с дивинилбензолом различной степени сшивки с привитыми к их поверхности группами $SO_3^-H^+$ (сильнокислые катионообменники) или $-COO^-Na^+$ (слабокислые катионообменники), $-CH_2N^+(CH_3)_3Cl^-$ (сильноосновные анионообменники) или $-N^+HR_2Cl^-$ (слабоосновные анионообменники).

Обменная емкость ионообменников для классической ИОХ 2-5 мгэкв/г, для ИХ - 0.001-0.05 мгэкв/г. Марки применяемых сорбентов: КУ-2, АВ-17, КанКАст, КанККст, Диасорбсульфо, ХИКС-1, ВАРС-1.

Сорбенты для гель проникающей хроматографии.

Основной тип - стирол-ДВБ. Используются также макропористые стекла, метилметакрилат, силикагель. Для ионо-эксклюзионной хроматографии используются те же сорбенты.

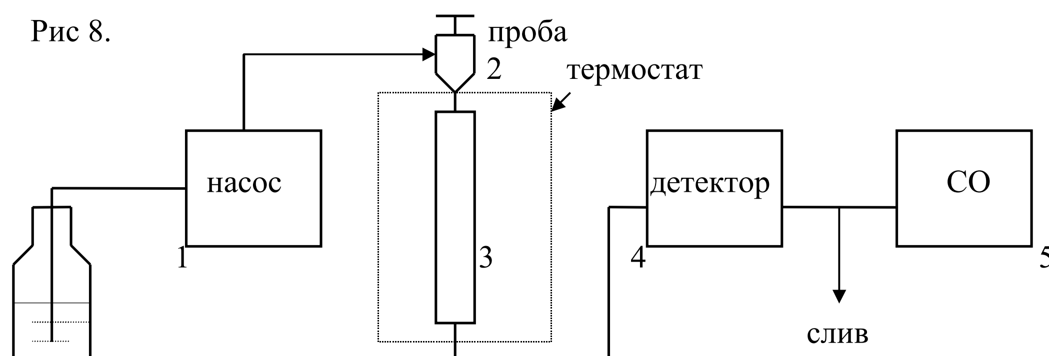
Сорбенты - самое слабое место отечественных производителей хроматографов. Практически ничего не выпускается, выбора нет, качества нет. Приходится переходить на дорогие зарубежные сорбенты.

V. ОБЩАЯ СХЕМА ЖИДКОСТНОГО ХРОМАТОГРАФА

Хотя жидкостная хроматография - это метод разделения пробы на компоненты, современный жидкостный хроматограф включает в себя не только систему разделения, но и систему количественного измерения содержания каждого компонента, т.е. систему детектирования (вместе с системой обработки хроматографического сигнала).

Для обеспечения анализа многокомпонентных смесей с высокой чувствительностью жидкостный хроматограф должен иметь в своем составе ряд блоков.

Рис 8.



Самая общая схема жидкостного хроматографа приведена на рис. 8. В состав любого хроматографа входят пять обязательных составных частей:

а) насос для подачи подвижной фазы через колонку;

б) дозатор для введения пробы в колонку;

в) разделительная колонка - сердце хроматографа;

г) детектор - устройство для получения аналитического сигнала, пропорционального концентрации компонента;

д) система обработки - преобразователь аналитического сигнала в форму удобную для восприятия человеком (или системой автоматического управления).

В состав хроматографа для удобства работы и расширения его аналитических возможностей могут входить ряд дополнительных устройств.

1) Устройство подготовки подвижной фазы. Функции - фильтрование и дегазация растворителей. Фильтрование - методом пропускания растворителя через фильтр 0.2-0.5 мкм перед заливкой его в емкость, или методом установки на входе насоса фильтра с небольшим сопротивлением. Дегазация - вакуум (из банки) или нагреванием, или пропусканием через растворитель инертного газа (Гелий).

2) Термостат колонок.

Адсорбция в ЖХ и ГХ - процесс термодинамический, зависит от температуры. Следовательно, величина удерживания зависит от температуры. Кроме того, от температуры зависит вязкость растворителя, что определяет эффективность колонки. Таким образом, все три основные характеристики колонки: селективность, емкость и эффективность зависят от температуры. Для стабилизации условий разделения, чтобы получить воспроизводимые времена удерживания, амплитуды пиков и хорошее разделение необходимо термостатирование колонок. Обычно температура термостата 30-50 ^{o}C, стабильность поддержания температуры - 0.3-0.5^{o}C. Как видно, условия разделения очень мягкие, не то что в ГХ (100-300^{o}C). Многие жидкостные хроматографы не имеют термостатов, так как колебания температуры в комнате не очень велики и воспроизводимость показаний приемлемая.

3) Послеколоночный реактор.

В ряде случаев трудно найти подходящий способ прямого детектирования выходящих из колонки компонентов (анализ аминокислот, определение тяжелых металлов и т.д.). В этом случае после колонки ставится реактор, где смешивается реагент и разделенные вещества (например, металлы). При этом получают интенсивно окрашенное соединение, которое можно детектировать на фотометре.

4) Автоматический дозатор (автосамплер).

Автоматический дозатор необходим в случае многократного повторения анализа больших серий однотипных образцов. При этом используется один расход растворителя, одна колонка. После окончания анализа (выхода последнего пика) производится автоматиче-

ский ввод следующей пробы. Сами пробы предварительно заливаются в ампулы, ампулы устанавливаются на специальном столике. Специальный насос засасывает из ампулы пробу, прокачивает ее через пробоотборную петлю дозатора. При повороте дозатора петля промывается элюентом и проба попадает в колонку.

5) Градиентное устройство.

В ряде случаев при разделении сложных смесей необходимо в процессе разделения изменять состав растворителя по определенному закону для ускорения анализа и улучшения разделения. Эту роль выполняет градиентное устройство.

Все основные узлы жидкостного хроматографа связаны между собой гидравлическими связями (насос - дозатор - детектор). Для этих целей обычно используются капилляры из нержавеющей стали внутренним диаметром 0.2-0.3 мм, наружным диаметром 1.0-1.6 мм. Эти капилляры могут выдерживать давление до 1000 атм., достаточно гибки и в условиях ЖАХ и в условиях ГХ не поддаются коррозии. Однако в ионообменной и ионной хроматографии коррозионная стойкость нержавеющей стали мала, происходит реакция железа, марганца, никеля, кобальта с реагентами, что вносит существенные помехи при определении этих металлов в пробе. В этом случае капилляры выполняются из титан-циркониевых сплавов. В последнее время за рубежом получили распространение капилляры из полиэтерэтеркетона (PEEK), обладающих высокой коррозионной стойкостью и большой механической прочностью (держат давление до 300-400 кгс/см^2). Однако их стоимость в 4-5 раза выше, чем у титановых капилляров. Применение фторопластовых капилляров себя не оправдало из-за их малой механической прочности.

Сорбенты , используемые в ЖХ, характеризуются высокой скоростью массопередачи, что достигается, главным образом, уменьшением размера частиц сорбента. Это позволяет работать при высоких линейных скоростях потока подвижной фазы, что резко сокращает время анализа. Но при малых размерах частиц сорбента высокая скорость потока через колонку может быть реализована в случае, если растворитель подается в колонку под высоким давлением (до 150-250 атм.).

Для обеспечения высокой скорости разделения колонки в ЖХ имеют небольшой размер. Но, чем меньше колонка, тем меньше, для исключения перегрузок, должен быть объем вводимой пробы (не более 1% от объема колонки). При этом уменьшается и объем растворителя, соответствующего хроматографическому пику. Для исключения расширения пика в детекторе объем детектора должен быть не более 10% от объема минимального пика (не более 10 мкл). Так как пробы вводится в дозатор очень мало, то детектор в ЖХ должен иметь высокую чувствительность.

Суммируя все эти данные, можно сформулировать требования к жидкостному хроматографу. В таблице 1 представлены характеристики типичной хроматографической колонки (а отсюда и характеристики прибора в целом).

Таблица 1

Параметр	**Значение**
Размер частиц сорбента, мкм	5 - 7.5
Длина колонки, см	15 - 25
Внутренний диаметр, мм	4.6
Эффективность, тыс. т.т.	10 -15
Расход подвижной фазы, мл/мин	1 - 2
Линейная скорость подвижной фазы, см/мин	15
Объем пика, мл	
при K'=1	0.1

К'=10	0.7
Рабочее давление на входе в колонку, атм	50 - 200
Продолжительность цикла разделения при К'=5, мин	10

VI. НАСОСЫ.

Для обеспечения расхода подвижной фазы через колонку с указанными параметрами используются насосы высокого давления.

К наиболее важным техническим характеристикам насосов для ЖХ относятся: диапазон расхода; максимальное рабочее давление; воспроизводимость расхода; диапазон пульсаций подачи растворителя.

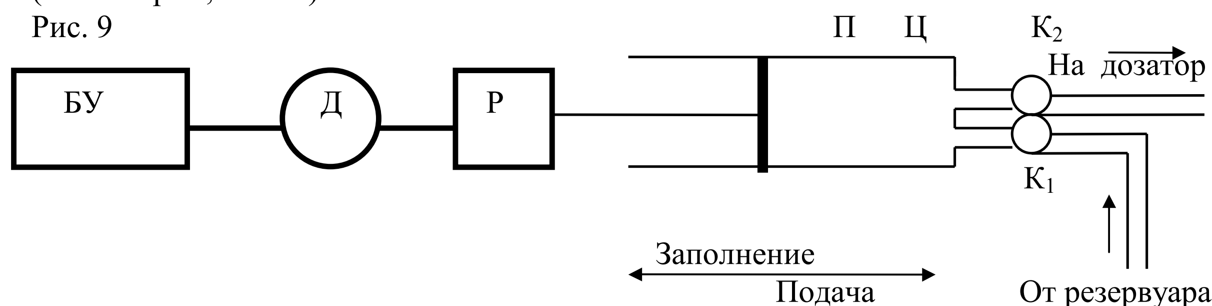
По характеру подачи растворителя насосы могут быть постоянной подачи (расхода) и постоянного давления. В основном при аналитической работе используется режим постоянного расхода, при заполнении колонок - постоянного давления.

По принципу действия насосы делятся на шприцевые и на плунжерные возвратно-поступательные.

Шприцевые насосы.

(Миллихром, Varian)

Рис. 9



Принцип действия.

Блок управления БУ подает напряжение на двигатель Д, определяющее скорость и направление его вращения. Вращение двигателя с помощью редуктора Р преобразуется в перемещение поршня П внутри цилиндра Д. Работа насоса осуществляется в 2 цикла. В цикл заполнения клапан $К_2$ закрыт, $К_1$ - открыт, растворитель поступает из резервуара в цилиндр Ц. В режиме подачи клапан $К_1$ закрыт, а через клапан $К_2$ подвижная фаза поступает в дозирующее устройство.

Для насосов этого типа характерно практически полное отсутствие пульсаций потока подвижной фазы в ходе работы.

Недостатки насоса:

а) большой расход времени и растворителя на промывку при смене растворителя;

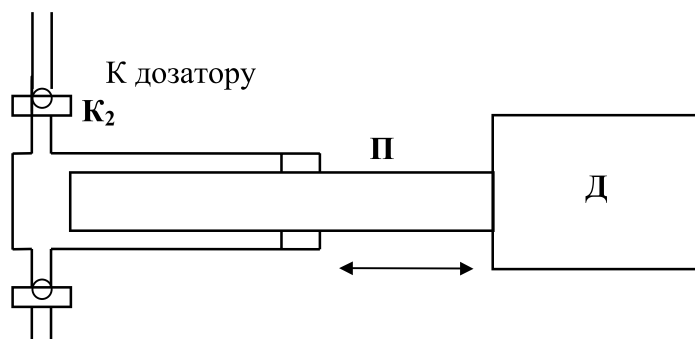
б) приостановка разделения во время заполнения насоса;

в) большие габариты и вес при обеспечении большого расхода и давления (нужен мощный двигатель и большое усилие поршня с его большой площадью).

Плунжерные возвратно-поступательные насосы.

(Цвет, Hewlett Packard, Perkin-Elmer и т.д.)

Рис 10



$К_1$

Принцип действия.

Двигатель Д через редуктор Р приводит в возвратно-поступательное движение плунжер П, перемещающийся в рабочей головке насоса. Клапаны $К_1$ и $К_2$ открываются, когда насос находится в фазе всасывания и подачи соответственно. Величина объемной подачи определяется тремя параметрами: диаметром плунжера (обычно 3.13; 5.0; 7.0 мм), его амплитудой (12-18 мм)и частотой(что зависит от скорости вращения двигателя и редуктора).

Насосы этого типа обеспечивают постоянную объемную подачу подвижной фазы длительное время. Максимальное рабочее давление 300-500 атм, расход 0.01-10 мл/мин. Воспроизводимость объемной подачи -0.5%. Основной недостаток - растворитель подается в систему в виде серии последовательных импульсов, поэтому существуют пульсации давления и потока. Это является основной причиной повышенного шума и снижения чувствительности почти всех детекторов, применяемых в ЖХ, особенно электрохимического.

Способы борьбы с пульсациями.

1. Сдвоенные насосы.

Рис 10

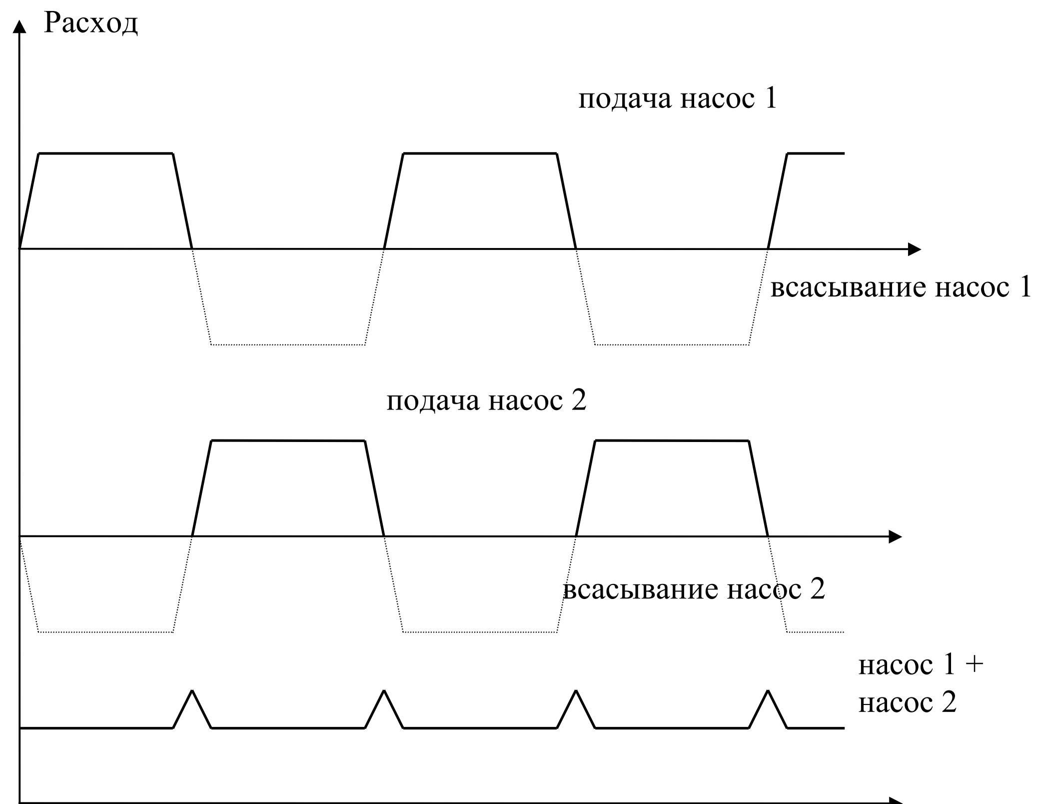
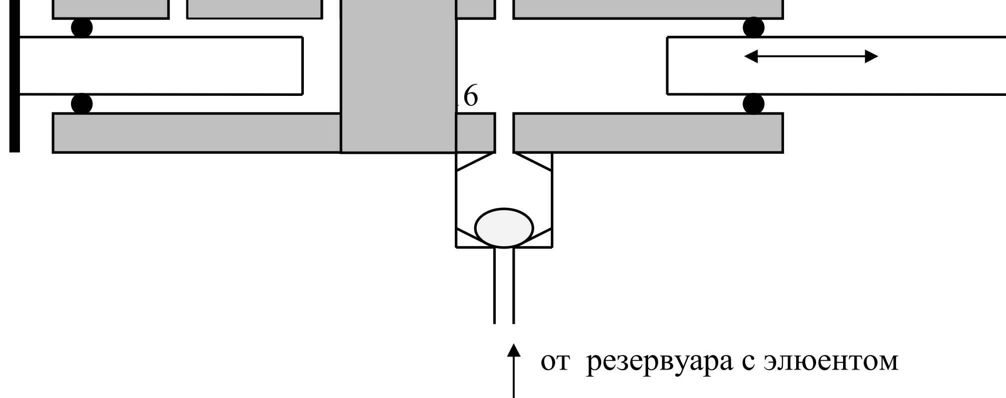


Схема двухплунжерного насоса Баглая.

Чем меньше диаметр плунжера, меньше его ход - меньше пульсации.

Рис 11.

К дозатору



2. Применение демпфирующих устройств.

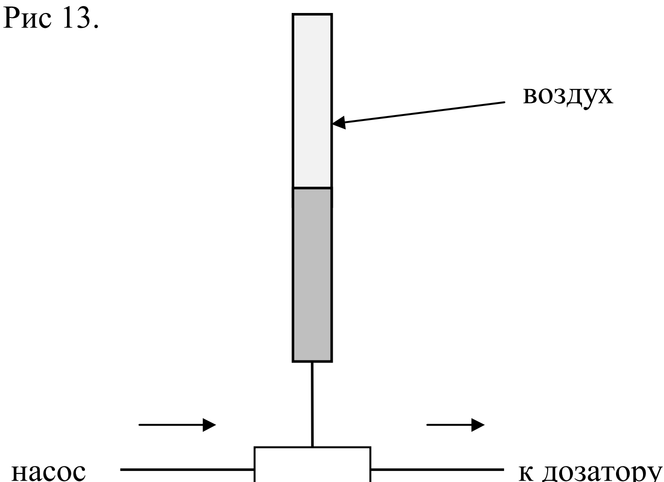
Это спиральные трубки специального профиля из нержавеющей стали, включенные последовательно или параллельно в систему между насосом и дозатором.

Рис 12 Профиль демпфера



Демпфер раскручивается при увеличении давления в нем (ускорение хода насоса). При спаде давления он скручивается, его объем уменьшается, он выдавливает из себя часть растворителя, поддерживая постоянным расход и уменьшая пульсации. Такой демпфер хорошо работает при давлении 50 атм и выше. При давления 5-30 атм лучше сглаживает пульсации воздушный демпфер, изготовленный из колонки (рис 13.). Воздух в заглушенной колонке (6x200 мм) сжимается и пульсации гасятся. Воздух в нем растворяется за 24 часа.

Рис 13.



3. Применение электронных устройств.

При использовании электронного датчика давления можно использовать показания датчика для управления работой насоса. При спаде давления увеличивается скорость вращения двигателя и компенсирует уменьшение давления. Также можно скомпенсировать утечки в клапанах и частично в манжетах. Применение электронного демпфера (БПЖ-80, ХПЖ-1 и т.д.) позволяет снизить пульсации давления до 1 атм при давлении 100-150 кгс/см^2.

VII. ДОЗАТОРЫ

Назначение дозатора заключается в переносе пробы, находящейся при атмосферном давлении, на вход колонки, находящейся при давлении вплоть до нескольких атмосфер. Важно, чтобы в дозаторе отсутствовали непромываемые подвижной фазой “мертвые” объемы и размывание пробы в ходе дозирования.

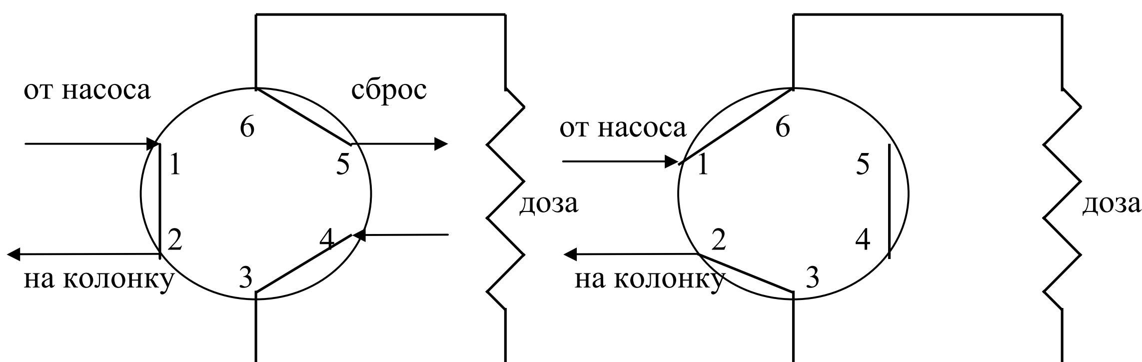
На первых порах дозаторы в ЖХ были аналогичны газовым с проколом мембраны. Однако более 50-100 атм мембраны не держат, химическая стойкость их недостаточна, их кусочки загрязняют фильтры колонок и капилляры.

В жидкой фазе гораздо меньше скорости диффузии, чем в газовой. Поэтому можно дозировать с остановкой потока - проба не успевает размыться в дозаторе. На время ввода в дозатор пробы специальный кран перекрывает поток растворителя. Давление на входе в колонку быстро снижается, через несколько секунд пробу можно вводить в камеру дозатора обычным микрошприцем. Далее дозатор запирается, включается поток растворителя, идет разделение. Давление, которое держит этот кран, до 500-800 атм. Но при остановке потока нарушается равновесие в колонке, что может приводить к появлению “вакантных” дополнительных пиков.

В “Милихроме” дозатором служит сам насос (при его обратном ходе засасывается проба).

Наибольшее распространение получили петлевые дозаторы (рис. 14).

Рис 14



При заполнении дозатора под высоким давлением оказываются входы 1,2 и канал между ними. Входы 3-6, каналы между ними и дозирующая петля оказываются под атмосферным давлением, что позволяет заполнить петлю с помощью шприца или насоса. При повороте дозатора поток подвижной фазы вытесняет пробу в колонку. Для снижения погрешности петля промывается 5-10-ти кратным объемом пробы. Если пробы мало то ее можно ввести в петлю микрошприцем. Объем петли обычно 5-50 мкл.

VIII. КОЛОНКИ

Успех ВЭЖХ обусловлен не только созданием сорбентов, но и колонок, учитывающих особенности процесса разделения в ЖХ. Наиболее важны 2 момента:

1. Создание максимально однородного слоя сорбента в цилиндрической трубке.
2. Сведение к минимуму мертвых объемов в колонке и соединительных трубках.

В аналитической практике в основном используются колонки внутренним диаметром 3-5 мм, длиной 5-25 см. На Милихроме d 2мм, что экономит подвижную фазу, но требует снижения в 4 раза мертвых объемов в системе (капилляры + детектор).

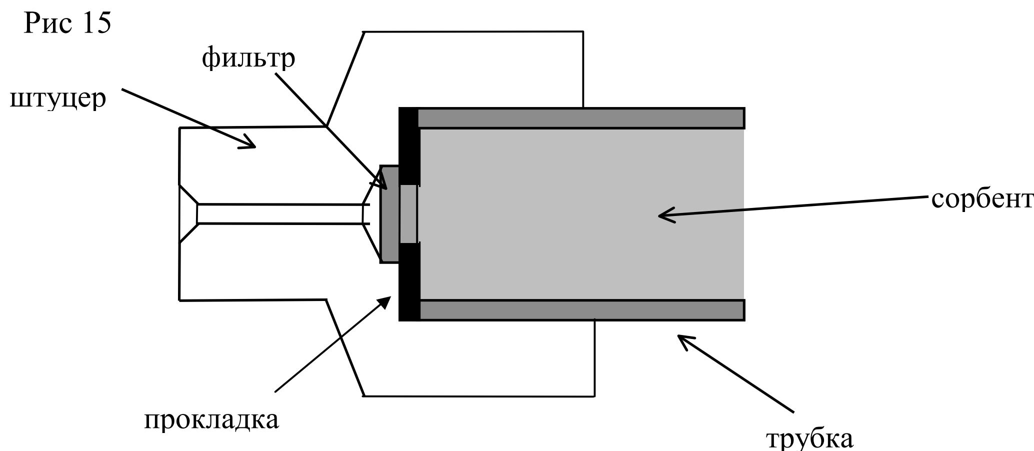
8.1. Устройство аналитических колонок.

Аналитическая колонка представляет собой трубку из нержавеющей стали, титана или стекла, заполненную сорбентом и закрытую с обеих сторон фильтрами для предотвращения высыпания сорбента. Фильтры имеют диаметр пор 2-5 мкм, что не создает сопротив-

ления потоку. Для получения высокой эффективности колонок необходимо соблюдение некоторых условий:

1. Внутренняя поверхность колонки должна быть зеркально гладкой.
2. Сорбент должен иметь однородную фракцию (5±1мкм).
3. Переход от большого диаметра колонки к малому диаметру штуцера должен быть плавный, т.е. нужна конусная выточка в корпусе штуцера (рис 15).

Рис 15



4. Стенка колонки должна быть достаточно прочной, чтобы выдержать давление 300-500 атм.

5. Между торцом колонки и фильтром не должно быть мертвого объема (воздушного зазора), что очень трудно обеспечить в соединениях типа “свагелок”.

Учитывая уникальные свойства сорбентов, сложную конструкцию колонок, тщательность набивки колонок и их тестирование, стоимость колонок составляет 1000-1500 долл.США (отечественные колонки 1 млн. руб.). Поэтому крайне желательно беречь колонки, предохранять от загрязнений с помощью предколонок, заполненных тем же сорбентом, но длиной 30-70 мм.

8.2. Заполнение колонок.

Приготовление хороших колонок является трудновоспроизводимой процедурой. Лишь многолетний опыт позволяет достичь повторяющихся хороших результатов.

Колонки с размером частиц > 50мкм можно упаковывать “всухую”, насыпая шпателем сорбент в колонку. Обычно так набиваются подавительные колонки для ионной хроматографии. После пропускания элюента через колонку сорбент набухнет и колонка будет плотно упакованной.

При размере частиц <50 мкм набивка производится суспензионным способом.

Самый простой способ заполнения колонок для ЖХ, сорбент силикагель: готовят суспензию - 5-10% сорбента в воде или изопропиловом спирте, количество сорбента на 20% больше, чем нужно для заполнения колонки (плотность сорбента - 0.5 г/см^3, объем колонки можно вычислить по размерам). Минут 10 перемешивают суспензию на магнитной мешалке. В это время колонку чистят ваткой с этанолом, заворачивают нижний штуцер с фильтром, заполняют пустую колонку растворителем (для того чтобы он не вытекал из колонки, к ее выходу подсоединяют капилляр, верхний конец которого выше колонки), соединяют верх колонки с прилагаемым к прибору наполнителем, далее выливают в наполнитель всю суспензию, закрывают наполнитель штуцером, к которому подсоединяют капилляр от насоса и дают максимальный расход (6-7 мл/мин) Первые 10 мин-15 мин насос работает на максимальном расходе, потом каждую минуту снижают расход на 1 мл/мин. Далее, снимают колонку. Смотрят, нет ли ямки у верха колонки, если есть, то колонку перебивают, добавив

сорбента. Если нет , то кладут немного стекловаты на верх сорбента и наворачивают верхний штуцер. Колонку ставят в прибор, чтобы элюент протекал в том же направлении, в котором производилась набивка.

Очень важным условием получения хороших колонок является седиментация сорбента: частички 1-2мкм забивают фильтры, снижают эффективность.

Чтобы колонка не “садилась” ,необходимо производить набивку колонки при давлении в 3-4 раза выше ее рабочего давления (т.е. 300-400 кгс/см^2).

Для хорошей колонки N=30000-100000 т.т./м.

IX. ДЕТЕКТОРЫ.

Детектор является преобразователем концентрации анализируемого вещества, растворенного в подвижной фазе, в электрический сигнал.

В первых жидкостных хроматографах (типа ионообменных хроматографов) прошедшая через колонку подвижная фаза с компонентами пробы просто собиралась в небольшие сосуды, а затем методами титриметрии, колориметрии, полярографии и т.д. определялось содержание компонента в этой порции. Т.е. процессы разделения пробы и определения ее количественного состава были разделены во времени и пространстве. В современном жидкостном хроматографе эти процессы объединены в одном приборе.

Для детектирования компонентов пробы может быть использовано любое физико-химическое свойство подвижной фазы (поглощение света, излучение света, электропроводность, показатель преломления и т.д.), которое изменяется при наличии в ней молекул разделяемых соединений. Из существующих 50 физико-химических методов детектирования в настоящее время активно используется 5-6.

Наибольшей сложностью при конструировании хроматографических детекторов было сочетание малых объемов ячеек (0.1-10 мкл, менее 10% от объема неудерживаемого пика) с высокой чувствительностью (ввиду малого объема и низкой концентрации пробы). Иллюстрацией достигнутых успехов является то, что чувствительность фотоколориметров и спектрофотометров составляет 10^{-2} ед.опт. пл-ти, в то время как чувствительность фотометрических детекторов - 10^{-5} ед.опт. пл-ти, т.е. в 1000 раз выше.

Чувствительность - это важнейшая характеристика детектора. Лучше всего оценивать этот параметр по физической величине. Если определять чувствительность через двойную амплитуду шума нулевой линии, шум выражать в физических единицах, то чувствительность фотометрического детектора будет выражаться в единицах оптической плотности, рефрактометрического - в единицах показателя преломления, вольт-амперометрического- в амперах, кондуктометрического - в сименсах. Для химика, очевидно, интереснее определять чувствительность в минимальном количестве определяемого вещества.

Из таблицы 2 можно оценить предельную чувствительность различных типов детекторов.

Чувствительность детектора может быть примерно одинаковой ко всем компонентам пробы (рефрактометр и кондуктометр), а может быть совершенно разной даже для близких соединений. В первом случае говорят о неселективном детектировании. Это значит, что измеряется физическое свойство, присущее и пробе и растворителю (показатель преломления, электропроводность), их разность. Во втором случае - селективное детектирование. Это значит, что измеряется физическое свойство, присущее только молекулам пробы, например, способность флуоресцировать или поглощать свет. Селективное детектирование, с одной стороны, позволяет повысить чувствительность определения или исключить те вещества, которые определять не нужно (предельные углеводороды при определении ароматики), с другой стороны, допускает возможность не обнаружить нужных нам компонентов (тех же предельных в нефти). Поэтому при исследовании общего состава объекта лучше использовать

неселективный детектор типа рефрактометра, при определении концентрации отдельных компонентов в сложной смеси лучше использовать селективные детекторы.

Таблица 2

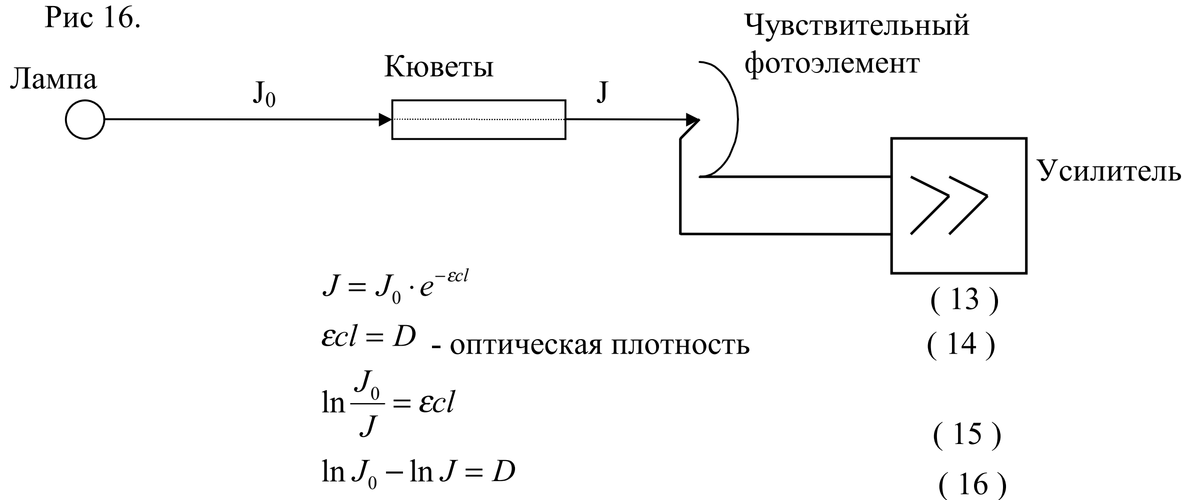
Детектор	**Измеряемое свойство подвижной фазы**	**Ориентировочная чувствительность, мг**	**Селек-тив-ность**
1.Фильтровый фотометрический	Оптическая плотность на определенной длине волны, пропускаемой фильтром	10^{-10}	Высокая
2. Спектрофотометрический	Оптическая плотность на выбранной длине волны монохроматора	10^{-9}	Высокая
3. Рефрактометрический	Разность показателей преломления растворителя и раствора с пробой	10^{-6}	Низкая
4. Флуориметрический	Интенсивность излучения молекул пробы в элюенте	10^{-11}	Очень высокая
5. Амперометрический	Ток окисления или восстановления электрохимически активных соединений	10^{-9}-10^{-11}	Очень высокая
6. Кондуктометрический	Электропроводность ионов пробы в элюенте (воде)	10^{-10}	Низкая

Рассмотрим кратко принципы работы различных детекторов в ВЭЖХ.

9.1. Фотометрический детектор.

В основу действия положен закон Ламберта-Бэра.

Рис 16.



$$J = J_0 \cdot e^{-\varepsilon cl} \quad (13)$$

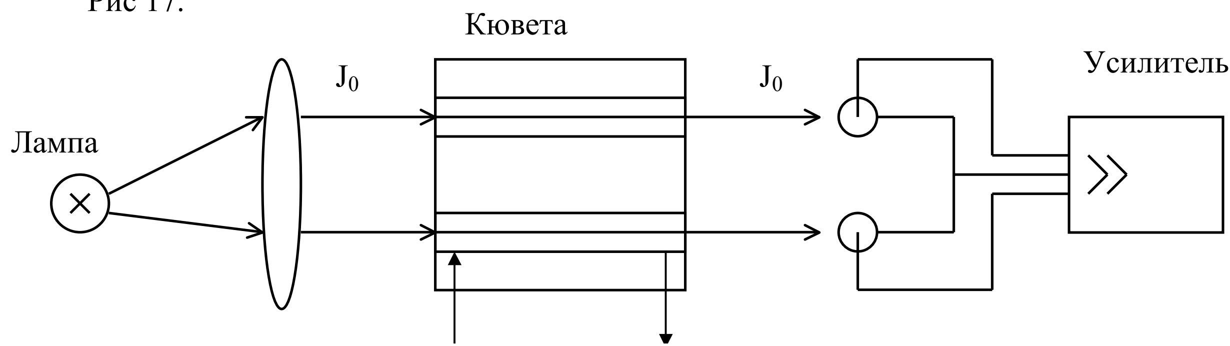
$$\varepsilon cl = D \text{ - оптическая плотность} \quad (14)$$

$$\ln \frac{J_0}{J} = \varepsilon cl \quad (15)$$

$$\ln J_0 - \ln J = D \quad (16)$$

Таким образом, если измерить токи фотоприемника от светового потока J_0 (канал сравнения), светового потока J (рабочий канал), прологарифмировать их и вычесть, то получим оптическую плотность D, которая пропорциональна концентрации C.

Рис 17.



J_0 J

поток растворителя

Чувствительность в физических единицах, которую мы можем замерить $D_{min}=10^{-5}$.

$\varepsilon = 10^5$ (молярный коэффициент поглощения)

l = 1 см.

$$ë = \frac{D}{\varepsilon \cdot l} \qquad (17)$$

$$C_{\min} = \frac{10^{-5}}{10^5 \cdot 1} = 10^{-10} \cdot \text{„‡Ú/ ‡}$$

Если l = 1 мм (как у Милихрома), то

$$C_{\min} = \frac{10^{-5}}{10^5 \cdot 0{,}1} = 10^{-9} \cdot \text{„‡Ú/ ‡}$$

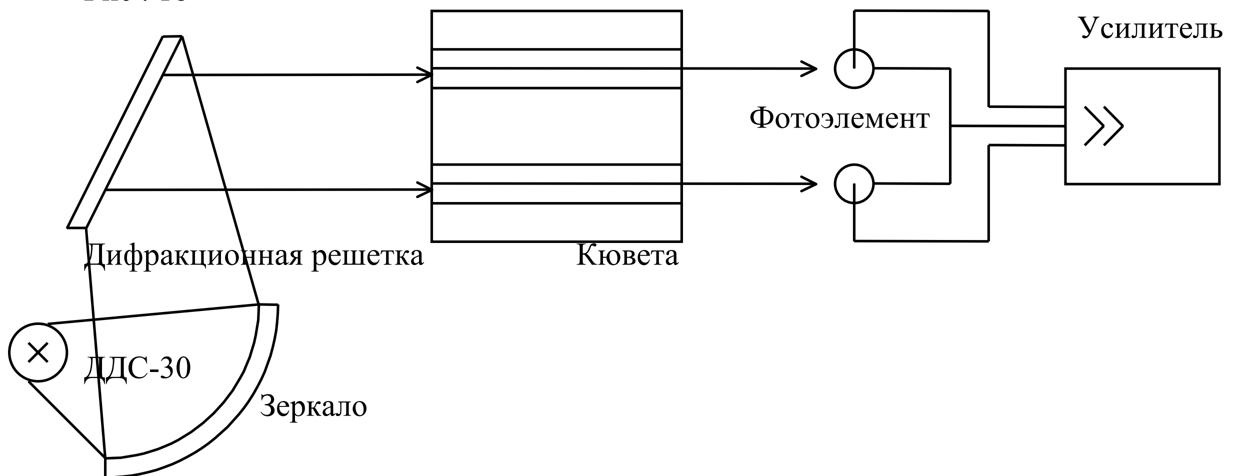
80% хроматографов оснащены этими детекторами.

Спектрофотометрические детекторы бывают следующих видов

а) Фильтровые, т.е. использующие интерфильтры (линии ртути 254,313, 365, 404, 434, 546 нм).

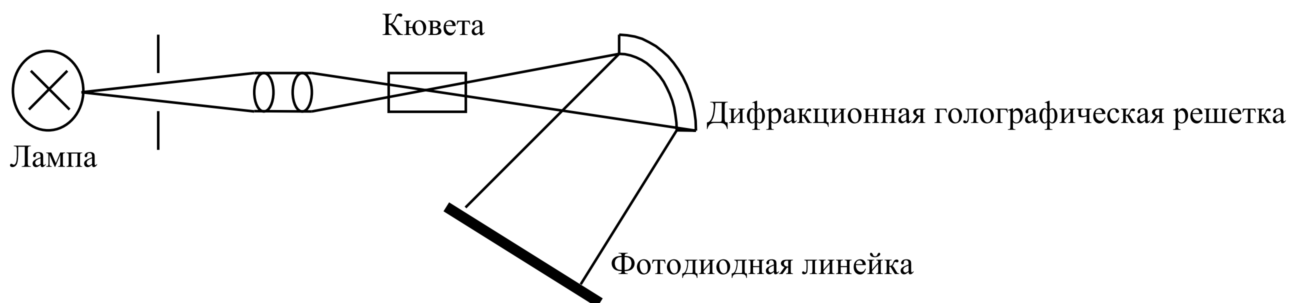
б) С переменной длиной волны от 200 до 700 нм.

Рис . 18



в) С фотодиодной матрицей

Рис 19.



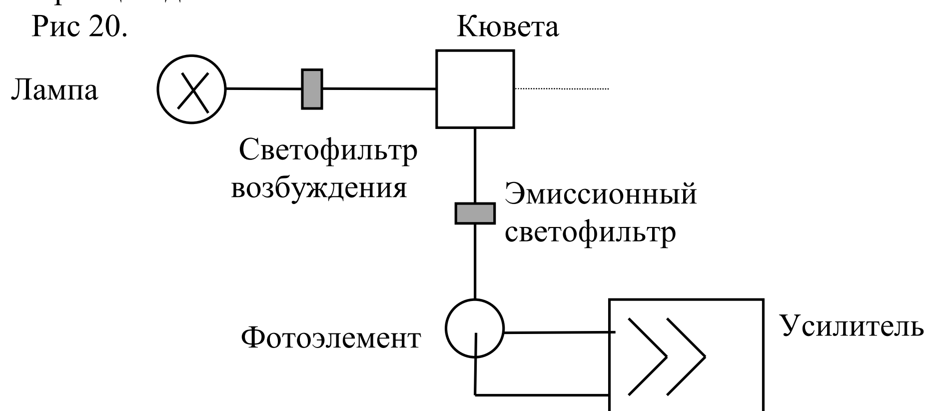
При анализе сложных смесей крайне желательно для идентификации подтвердить хроматографические данные данными спектрального анализа.

9.2. Флуориметрический детектор.

Этот детектор обладает наиболее высокой чувствительностью. В настоящее время один из самых распространенных детекторов.

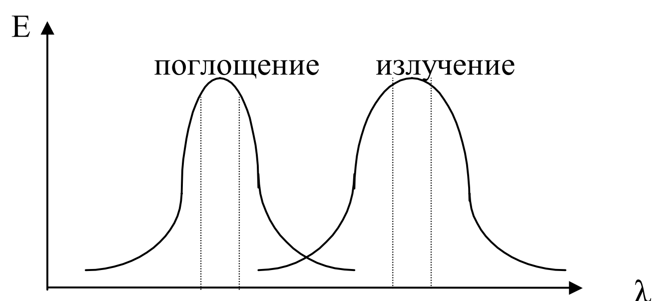
Принцип действия.

Рис 20.



Ряд веществ (ПАВ, витамины, стероиды, сложные органические соединения) обладают способностью светится под действием возбуждающего излучения. Спектры поглощения и излучения имеют вид.

Рис. 21.



Поэтому ставится 2 фильтра, чтобы отделить излучение люминисценции от рассеянного возбуждающего света. Иногда вместо возбуждающей лампы применяют лазер (как в Цвет-3110). В этом случае чувствительность увеличивается в 100-10 раз за счет, во-первых, более концентрированного возбуждения (вся энергия лазера сосредоточена в его луче, который попадает в кювету), во-вторых, за счет лучшего перекрытия.

Интенсивность люминисценции пропорциональна интенсивности возбуждающего света (в отличии от фотометров).

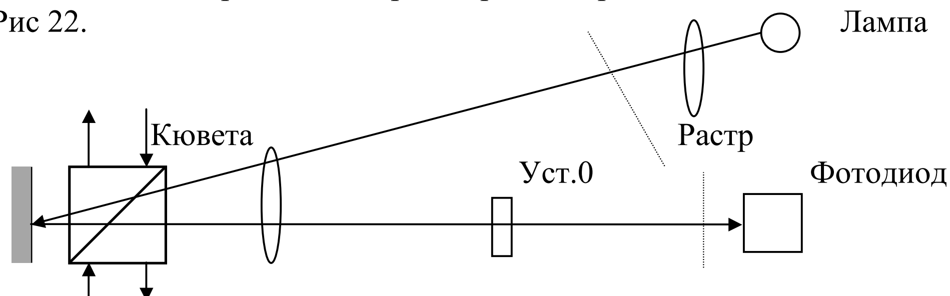
$$J_{л} = J_0 \cdot C \cdot K \qquad (18)$$

Несветящиеся вещества можно связать со светящимся реагентом.

9.3. Рефрактометрический детектор.

Это детектор универсального (неселективного) типа. Принцип действия - измерение изменения показателя преломления растворителя при нахождении в нем молекул пробы.

Рис 22.



Кювета состоит из двух призм. Через одну кювету протекает растворитель, через другую растворитель с пробой. Если через обе кюветы течет растворитель, то растры совмещаются, освещение фотоприемника минимальное. Если через кювету течет проба, луч из-за изменения показателя преломления отклоняется, растры расходятся, освещенность фотоприемника растет, сигнал растет.

Это - детектор по отклонению луча. Есть детектор по отражению, с более низкой чувствительностью (Френелевского типа). Наконец, есть детектор, основанный на интерферометрическом принципе измерения разности хода двух лучей.

Применение: гель-хроматография, анализ предельных углеводородов, пластмасс и т.д., где большие концентрации и нет поглощения.

9.4. Электрохимический детектор.

За последние годы электрохимический детектор все более широко применяется в жидкостной хроматографии.

Достоинства детектора:

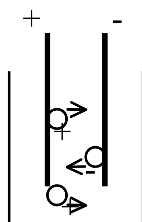
- очень высокая чувствительность,
- регулируемая селективность,
- малый объем ячейки (малое размывание после колонки),
- низкая температурная зависимость.

Недостатки детектора:

- высокие требования к чистоте электродов (нестабильность во времени), нужна чистка,
- значительная зависимость от скорости потока.

Принцип работы детектора.

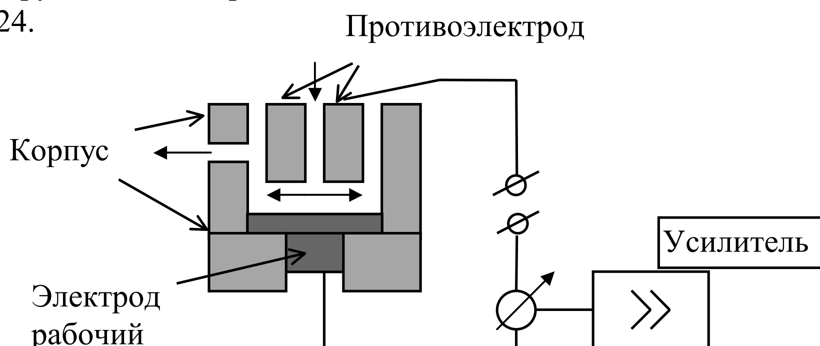
Рис 23.



Электрохимическая ячейка. В нее опущены 2 электрода. К ним подключено напряжение (от 0 до 2 В). В растворе находится смесь веществ в виде ионов и молекул. Через раствор протекает ток, связанный с движением ионов: отрицательно заряженные ионы движутся к

положительному электроду, там отдают свои электроны (восстанавливаются) и в виде нейтральных веществ (органических или металлов) осаждаются на электроде. Положительно заряженные ионы движутся к отрицательному электроду, получают там электроны (окисляются). В результате во внешней цепи появляется ток электролиза. Он является мерой концентрации вещества в растворе. Надо отметить, что восстановление или окисление каждого вещества происходит при определенном потенциале электродов (от 0 до ±2В). Поэтому, если потенциал ниже определенного (примерно 1В), то все вещества, имеющие потенциал окисления выше этого значения, не будут окисляться, следовательно, не будут чувствоваться, т.е. детектор будет селективен. Следовательно, можно определить вещества, даже если они не могли быть разделены на колонке (ион-селективное детектирование).

Конструкция детектора
Рис 24.



Материал рабочего электрода - стеклоуглерод, золото, платина, серебро, графит.

В процессе работы измеряется ток между рабочим электродом и вспомогательным (корпусом). Ток обычно 1 нА - 1 мкА. В хороших детекторах шумовой ток составляет 0.01-0.05 нА. При таких токах очень важно качество всех электрических контактов, особенно между рабочим электродом и измерительной цепью.

Так как в процессе работы происходит электролиз, т.е. разрушение пробы, то доля пробы, подвергающаяся электролизу, зависит от того с какой скоростью течет элюент. Обычно это 10-15%. Зависимость сигнала от скорости потока очень сильная.

Если рабочий электрод выполнить из пористого графита, пропустить сквозь него весь поток, тогда % электролиза может достигнуть 100. Детектор будет мало чувствовать скорость потока. Такой детектор называется кулонометрическим.

Сфера применения детектора:

- определение фенолов (1 ПДК - 1 мкг/л),
- определение катехоламинов в медицине (адреналин, норадреналин, дофамин),
- определение пестицидов,
- определение нитрозоаминов.

Импульсный детектор - автоматическая очистка рабочего электрода.

9.5. Кондуктометрический детектор.

Если в ЭХ детекторе измеряется ток поляризации, т.е. ток, который обусловлен переходом с электрода в раствор электронов в результате окисления вещества или с раствора на электрод - в результате восстановления вещества, то в кондуктометрическом детекторе измеряется ток между электродами, обусловленный просто передвижением ионов в растворе. Разница в том, что в ЭХ детекторе к электродам приложено постоянное напряжение, а в кондуктометрическом - переменное (5-10 кГц) той же величины (0.5-2 В). Электронная схема измерения, соответственно, другая.

Кондуктометрический детектор (по электропроводности) пригоден для обнаружения самых разнообразных ионов.

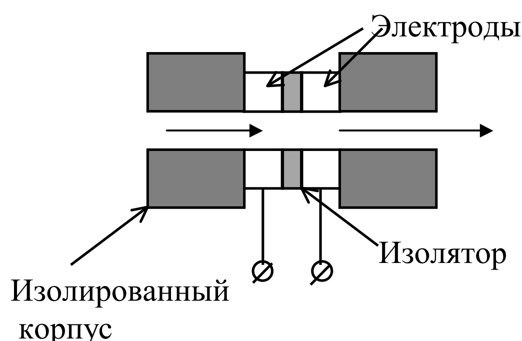
Электропроводность G = 1 / R, измеряется в сименсах См.

Для достаточно разбавленных растворов электропроводность измеряется в микросименсах (мкСм).

Электропроводность разбавленных растворов различных ионов различна, она зависит от подвижности ионов. Например, для ионов H^+ она равна 350 условных единиц, для OH^- - 198 у.е., для F^-, Cl^-, Br^-, NO_3^-, Na^+, K^+, NH_4^+, Mg^+ и т.д. в пределах от 50 до 80 у.е. Поэтому отклик разных веществ (сигнал детектора) при их одинаковой концентрации несколько разный. Если определяемые ионы заместить на ионы H^+ и OH^-, то сигнал возрастет в 3-7 раз. На этом основано "химическое" усиление сигнала в методе двухколоночной ионной хроматографии.

Простейшая схема кондуктометрического детектора.

Рис 25.



Электроды кондуктометрического детектора обычно выполняются из нержавеющей стали. Однако при попадании на электроды щелочного раствора происходит их пассивация и сопротивление поверхностного слоя увеличивается. Сигнал детектора падает в несколько раз. Для очистки можно пропустить через детектор азотную кислоту или механически очистить электроды. Для исключения этого явления электроды можно делать из титана.

Измеренная электропроводность определяется формулой:

$$G = \frac{K \cdot A}{l} \qquad (19)$$

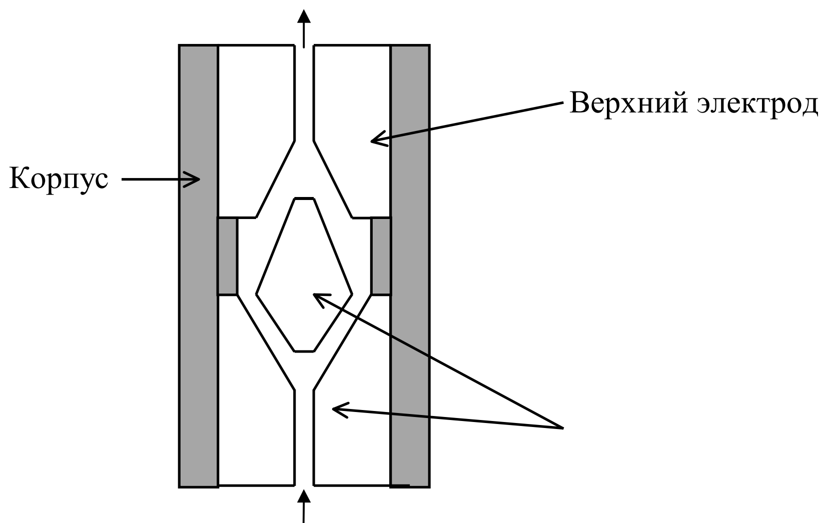
где К - удельная электропроводность,

А - площадь электродов, $см^2$,

l - расстояние между электродами, см.

Для увеличения G (т.е. чувствительности) в Цвет-3006 используется форма ячейки с развитой поверхностью.

Рис 25



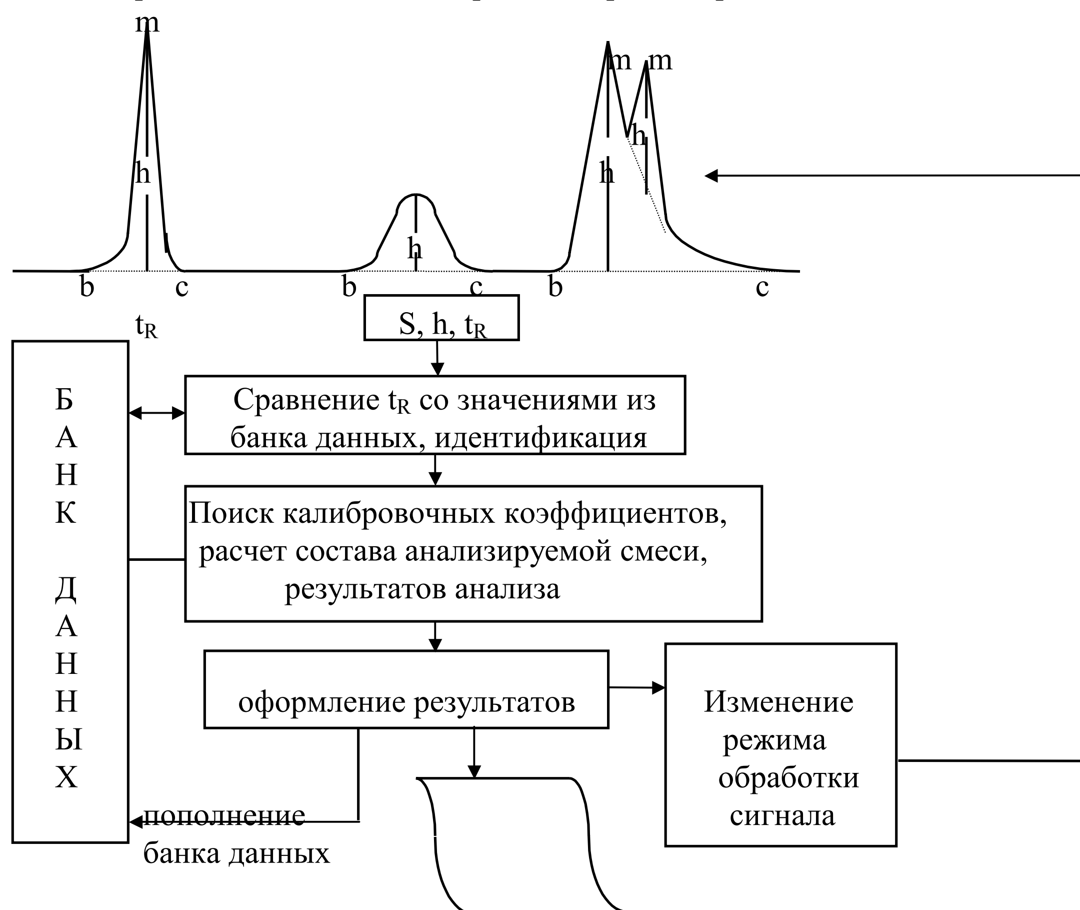
Нижний электрод

Подвижность ионов изменяется с изменением температуры 2% на 1^0С. Поэтому изменение температуры компенсируется с помощью термистора и компенсационной схемы. Ячейку нужно поместить в термоизолирующий корпус. Для компенсации фонового сигнала детектора от проводимости растворителя предусмотрена электронная компенсация (около 3 порядков сигнала образца).

X. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ.

Простейшее устройство для регистрации сигнала детектора - обычный потенциометрический самописец, с помощью которого хроматограмма отображается в координатах "время-сигнал детектора". Она содержит, хотя и в неявном виде, всю новую информацию об изучаемом объекте, однако ее необходимо перевести в форму пригодную для обработки.

Рис 27. Принципиальная схема обработки хроматограмм.



Все проводимые при этом операции могут выполняться вручную либо с помощью средств автоматизации различных классов. Ручная и автоматизированная обработка данных содержит много общих операций, однако отличаются по способу измерения площади пика. Последняя, при ручной обработке, измеряется как произведение высоты пика на ширину на половине высоты, а при автоматизированной - методом численного интегрирования. Операции, выполняемые при обработке хроматограмм:

-проведение базовой линии,

-выявление моментов начала и конца пиков,

-выявление максимумов пиков,

-измерение площади (или высоты) пиков,

-идентификация пиков по временам удерживания,

-расчет состава анализируемой смеси.

Как вид современных жидкостных хроматограмм, так и характер получаемой информации ничем не отличаются от таковых для ГХ. Поэтому почти все результаты, достигнутые при автоматизации ГХ, применимы для ЖХ.

Основные классы средств автоматизации.

Вычислительные интеграторы (типа САА-06) позволяют автоматически проводить базовую линию, измерить времена удерживания и площади пиков. Времена удерживания сравниваются с данными в памяти, на основании чего проводится идентификация пика и выбор значений калибровочных коэффициентов. Измеренные площади пиков и взятые из базы данных коэффициенты служат для расчета состава исследуемой смеси. На долю оператора обычно остаются лишь функции контроля и оптимизации параметров интегрирования, а также оформление результатов. Многие современные модели одновременно дают и графическое изображение хроматограммы.

Вычислительные машины позволяют практически беспредельно расширить круг операций с полученными данными. На их базе можно организовать большие банки данных, проводить изощренный статистический анализ результатов множества определений, автоматический поиск оптимальных условий. Одна и та же хроматограмма может обрабатываться многократно, появляется возможность эффективного диалога с оператором, учета его опыта и интуиции. Кроме того, ПЭВМ способны взять на себя функции управления всеми узлами хроматографа.

Практически все современные зарубежные хроматографы снабжены “хроматографическими станциями данных”- ПЭВМ. В России, часть приборов имеет собственные ПЭВМ, другие могут быть связаны с ПЭВМ. Есть значительное количество программ обработки .

XI. МЕТОДЫ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

11.1. Нормально-фазовая хроматография.

Разделение методом нормально-фазовой хроматографии осуществляется в результате взаимодействия вещества с адсорбентами, такими как силикагель или оксид алюминия, имеющими на поверхности активные центры. Различие в способности к взаимодействию с адсорбционными центрами разных молекул пробы приводит к их разделению на зоны в процессе движения с подвижной фазой по колонке. Достигаемое при этом разделение зон компонентов зависит от взаимодействия как с растворителем, так и с адсорбентом.

В основе сорбции на поверхности адсорбента, имеющего гидрооксильные группы, лежит специфическое взаимодействие между полярной поверхностью адсорбента и полярными (или способными поляризоваться) группами или участками молекул. К таким взаимо-

действиям относят диполь-дипольное взаимодействие между постоянными или индуцированными диполями, образование водородной связи вплоть до образования π-комплексов или комплексов с переносом заряда. Возможным и достаточно частым в практической работе является проявление хемосорбции, которая может привести к значительному повышению времени удерживания, резкому снижению эффективности, появлению продуктов разложения или необратимой сорбции вещества.

Наибольшее применение в ВЭЖХ находят адсорбенты из силикагеля с разным объемом пор. Это связано с высокой механической прочностью силикагеля, что позволяет упаковывать его в колонки и использовать при повышенных давлениях, характерных для ВЭЖХ. Обычно используют колонки диаметром 4 мм и длинной 100-250 мм заполненных силикагелем фракцией 5-10 мкм. Такие колонки при расходе подвижной фазы 1.0-2.0 $см^3$/мин работают при давлении 50-100 атм.

В качестве подвижной фазы в нормально-фазовой хроматографии используют неполярные растворители такие как н-гексан, н-гептан, изооктан с небольшой добавкой метанола, этанола или изопропилового спирта (1-10%). Практическое использование нормально-фазовой хроматографии крайне затруднено из-за микроколичеств влаги, содержащейся в растворителях, которая закрывает адсорбционные центры силикагеля. При этом постоянно изменяются (плывут) времена удерживания разделяемых компонентов. Детектор, обычно используемый для данного метода - УФ-спектрофотометр длительное время выходит на режим из-за дрейфа нулевой линии. Есть много методов борьбы с этими явлениями, но гораздо проще работать в обращенно-фазовой хроматографии и при этом достигать аналогичных результатов разделения компонентов.

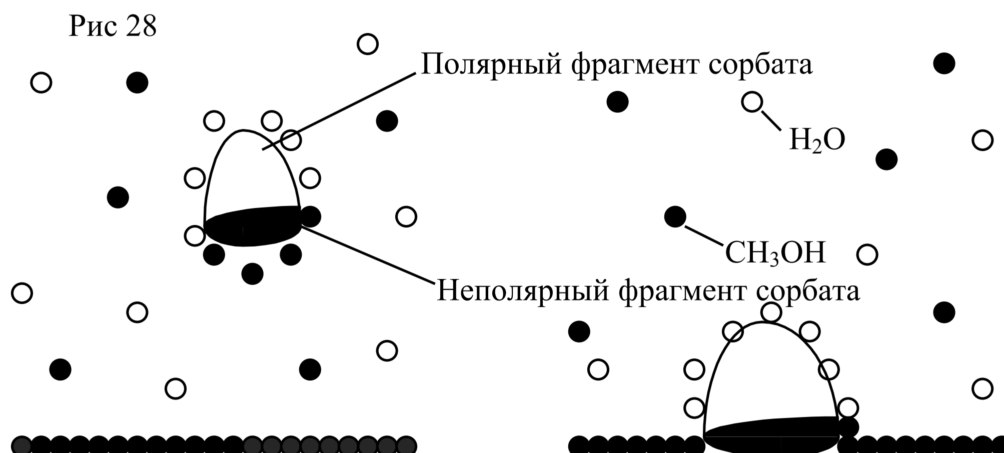
Для рутинных анализов используется только методика анализа афлатоксинов, основанная на методе нормально-фазовой хроматографии. Разработана эта методика институтом питания г.Москва. Работа с такими растворителями, используемыми в ней, как диэтиловый эфир, крайне неудобна.

Метод нормально-фазовой хроматографии оправдан когда необходимо получить разделение изомеров положения, например м-, о-, п-крезолов, ксилолов и т.д.

11.2. Обращенно-фазовая хроматография.

Вариант жидкостной хроматографии, в котором используют сорбент с привитыми неполярными (как правило, длинными алкильными или алкилсилильными) группами и полярный растворитель, например водный метанол, получил название обращенно-фазной ВЭЖХ.. Этот не совсем удачный термин, указывающий на перемену полярности неподвижной и подвижной фаз на противоположные в данном варианте ВЭЖХ, прижился и стал общепринятым, означающим: подвижная фаза - полярна, неподвижная - неполярна.

Рис 28



Поверхность сорбента

Существует принципиальное различие между процессами сорбции на полярных поверхностях из относительно неполярных растворителей (нормально-фазовый режим) и сорбции из воды либо сильнополярных растворителей на поверхностях неполярных. Причиной ассоциации на неполярных поверхностях являются, так называемые, сольвофобные взаимодействия в подвижной фазе. Для полярных подвижных фаз, в особенности содержащих воду, характерно сильное кулоновское взаимодействие и образование водородных связей между молекулами растворителей. Все молекулы в таких растворителях связаны довольно прочными межмолекулярными силами. Для того чтобы поместить в эту среду молекулу сорбата, необходимо образование "полости" между молекулами растворителя. Энергетические затраты на образование такой "полости" лишь частично покрываются за счет взаимодействия полярных групп в молекуле сорбата с полярными молекулами растворителя. В аналогичном положении по отношению к растворителю находятся и неполярные молекулы неподвижной фазы. С энергетической точки зрения более выгодно такое положение, когда поверхность раздела между полярной средой (растворителем) и неполярными фрагментами неподвижной фазы и молекул сорбата минимальна. Уменьшение этой поверхности и достигается при сорбции (рис. 28). Таким образом, причиной сорбции в обращенно-фазовой хроматографии служит сильное притяжение полярных молекул растворителя одна к другой, как бы "прижимающее" растворенные менее полярные молекулы к неполярной поверхности.

В отличии от недостаточно удачного названия сам метод оказался настолько удачным, что в настоящее время является основным в ВЭЖХ, 60-70% работы в данное время проводят этим методом. В чем же причина такой популярности?

Причин таких несколько. Были разработаны и быстро внедрены в производство сорбенты для этого метода, имеющие привитые алкильные группы различной длины (от C_2 до C_{22} с прямой алкильной цепью, фенильной и дифенильной группами). Растворители, используемые для этого метода (ацетонитрил, метанол, вода), позволяют работать в широком УФ-диапазоне, так как они УФ-прозрачны со 190-210 нм. Это позволяет применять наиболее популярный детектор - УФ-спектрофотометр. Растворители, используемые в обращенно-фазных разделениях, относительно легко растворяют практически все важнейшие группы веществ, находящихся в организме человека, биологических объектах, используемых в виде лекарственных препаратов, пестицидов, гербицидов, широко используемых в органической химии, нефтехимии, биологической химии. Сорбенты в обращенно-фазной ВЭЖХ быстро приходят в равновесие с новыми растворителями и при изменении состава растворителя, что позволяет переходить от одной методики к другой с использованием одной и той же колонки, а также широко применять градиентное элюирование с быстрым восстановлением равновесия сорбента с исходным растворителем. Загрязненный сорбент в колонке может быть промыт и приведен снова в рабочее состояние при прокачивании через колонку растворителей, удаляющих загрязнения.

Наиболее популярный сорбент в обращенно-фазной хроматографии - силикагель с привитыми алкильными цепочками, число атомов углерода в которых восемнадцать. Широко распространены такие марки, как Силасорб-С18, Сепарон-С18, Партицил-ODS (ODS - означает октадецилсилан). Нужно принимать во внимание, что характеристики удерживания и селективности для обращенно-фазных сорбентов меняются не только при переходе от сорбента одного производителя к сорбенту другого, но и при переходе от одной партии сорбента к другой партии того же производителя. При создании методики анализа методом жидкостной хроматографии невозможно задать жесткие условия состава элюента из-за вариации свойств сорбентов, как правило, небольшое изменение процентного состава (до 10%) элюента необходимо для оптимизации разделения. Это должны понимать метрологические службы.

На сорбентах С18 выполняются такие популярные анализы, как определение полиядерных ароматических углеводородов (бенз-а-пирен, хризен, пирен, антрацен и т.д.), ароматики (бензол, толуол, ксилолы и т.д.), фенолов (фенол, хлорфенолы, нитрофенолы ...), микотоксинов (афлатоксины, охратоксин, зеараленон, патулин), триазиновых гербицидов, карбаматных пестицидов, антибиотиков, наркотических веществ ....

Кроме силикагелей С18 в хроматографии используют силикагели с привитыми циано- (CN) и амино- (NH_2) группами. Эти фазы нашли широкое применение в биологии, медицине, биохимии, фармакологии и др.

11.3. Ионная хроматография

Ионная хроматография - это метод основанный на ионообменном разделении органических и неорганических ионов с последующим кондуктометрическим детектированием.

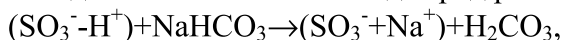
Двухколоночная ионная хроматография - метод, представляющий собой сочетание ионообменной хроматографии с детектированием по электропроводности и компенсацией электропроводящего фона элюента.

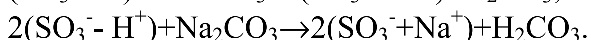
Элюенты, используемые при ионообменных разделениях, содержат сильные электролиты и обладают высокой электропроводностью. Ионная хроматография с подавлением фона основана на использовании второй ионной колонки, названной подавительной (компенсационной), стоящей после разделительной. Эта вторая колонка превращает элюент в раствор с низкой электропроводностью после того, как произошло разделение компонентов пробы. Срок службы подавительной колонки ограничен так, как происходит ее насыщение ионами элюента. После насыщения колонка может быть восстановлена 0.5-1.0 моль/л раствором NaOH для анионообменника и 0.5-1.0 моль/л раствором HNO_3 для катионообменника, после чего промыта дистиллированной водой. Срок службы подавительной колонки 8-10 часов, время регенерации 0.5 часа.

Разделение анионов.

На рис. 29 показана схема разделения анионов, реализованная на ионном хроматографе Цвет-3006М . Разделительная колонка низкой емкости обеспечивает высокоэффективное разделение ионных групп. Анионы пробы и элюента конкурируют за фиксированные активные центры смолы. Группы с более высоким сродством к смоле будут удерживаться на колонке дольше. Наиболее распространенные элюенты для разделения анионов смеси - $NaHCO_3$, Na_2CO_3.

В подавительной колонке идет ряд реакций. Анионы элюента реагируют со смолой:


$(SO_3^{-}\text{-}H^{+})+NaHCO_3\rightarrow(SO_3^{-}+Na^{+})+H_2CO_3$,

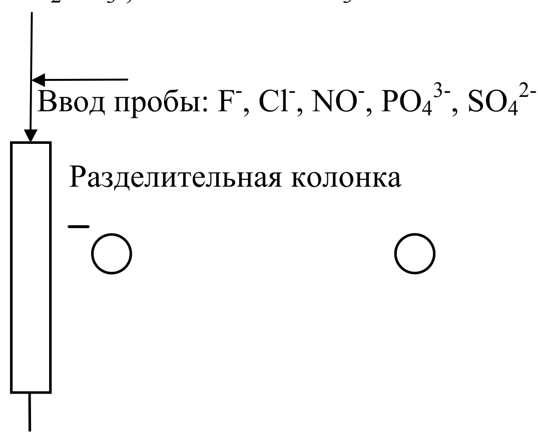

$2(SO_3^{-}\text{-}\ H^{+})+Na_2CO_3\rightarrow2(SO_3^{-}+Na^{+})+H_2CO_3$.

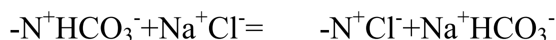
В каждом случае катион натрия обменивается с протонами смолы подавительной колонки. В результате элюирующий анион превращается в группы с низкой электропроводностью H_2CO_3.

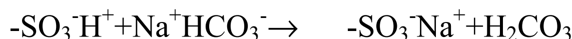
Рис29.

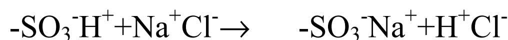
Элюент из насоса

3мМ Na_2CO_3 , 2.4мМ $NaHCO_3$









Детектор
H^+Cl^-

XII. ПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ.

12.1. Элюирующая сила и эффективность.

Подвижная фаза в ЖХ выполняет двоякую функцию: с одной стороны, она обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке. С этой точки зрения химические свойства подвижной фазы не играют существенной роли, более важны их физические свойства - вязкость, летучесть. С другой стороны, подвижная фаза в ЖХ играет активную химическую, по существу, роль. Молекулы подвижной фазы взаимодействуют с другими компонентами системы: молекулами разделяемых веществ и молекулами неподвижной фазы. Поэтому вторая и более важная функция подвижной фазы сводится к регулированию констант равновесия, к регулированию удерживания. Возможности регулирования удерживания с помощью подвижной фазы необычайно велики. Нередко, заменой одного растворителя на другой, можно изменить коэффициент емкости К’ в 1000-10000 раз, однако для практической хроматографии пригоден лишь довольно узкий диапазон величин К’ - примерно 1 - 20. Слишком малые значения К’ непригодны, т.к. в этой области резко возрастает вероятность взаимного перекрытия пиков. Наоборот, если К’ слишком велико, для разделения требуется слишком много времени, к тому же увеличивается риск не обнаружить более прочно сорбирующиеся компоненты смеси.

Таким образом, для решения каждой конкретной задачи состав как подвижной, так и неподвижной фазы должен быть тщательно подобран с точки зрения физических и химических свойств ее компонентов.

Основными характеристиками подвижных фаз являются их элюирующая сила и селективность.

Один из элюентов способен смыть с колонки лишь слабосвязанные сорбаты, другие же вызывают десорбцию почти любых молекул. Молекулы подвижной фазы могут взаимодействовать с молекулами разделяемых веществ. При этом образуются ассоциаты, которые взаимодействуют с неподвижной фазой, сила этого взаимодействия отличается от силы взаимодействия молекул пробы. В результате сорбция может стать более или менее прочной. С другой стороны, молекулы подвижной фазы могут конкурировать на поверхности сорбента с молекулами разделяемых соединений, вытесняя последние с активных центров и способствуя смещению равновесия в сторону десорбции.

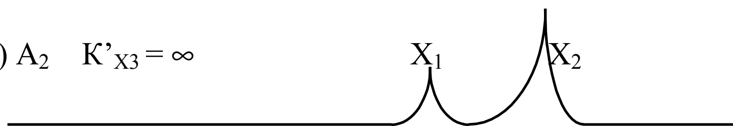
Для характеристики влияния подвижной фазы на удерживание используют понятие элюирующей силы.

Рис 30.

а) A_1 $K'_{X1}, K'_{X2}, K'_{X3} = \infty$ слабый элюент



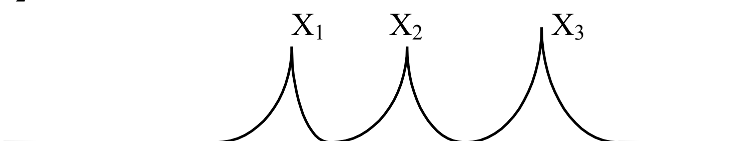
б) A_2 $K'_{X3} = \infty$ сильнее чем A_1



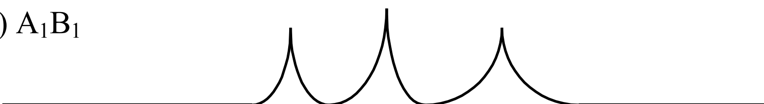
в) B_1 очень сильный



г) B_2 оптимальный



д) A_1B_1 оптимальная смесь



Элюирующая сила подвижной фазы - это ее свойство вступать в такие межмолекулярные взаимодействия с компонентами системы, которые способствуют десорбции разделяемых соединений, более быстрому перемещению хроматографических зон.

Растворитель один подобрать трудно. Зато смесь растворителей очень увеличивает гибкость ВЭЖХ. Принцип составления таких смесей прост. Необходимо взять два индивидуальных растворителя, один из которых имеет заведомо недостаточную элюирующую силу (A_1, A_2), другой - заведомо избыточную (B_1). Из этих двух растворителей можно приготовить множество различных подвижных фаз. Часть из них будет обязательно обладать подходящей элюирующей силой (A_2,B_1).

Сила растворителя является экспериментально определяемым интегральным параметром. Когда мы говорили, что растворитель имеет подходящую силу, под этим имеется ввиду, что на данном сорбенте данный сорбат будет иметь приемлемое значение К'. В то же время ясно , что для разделения уже двух соединений подойдет не любая из подвижных фаз, имеющих необходимую силу. Вещества могут иметь хорошее удерживание, но часть пиков перекрывается. В таких случаях мы говорим, что селективность системы недостаточна. Селективность (при данной НФ) определяется селективностью ПФ, что связано со специфическими взаимодействиями с сорбатами. Селективность, как и элюирующая сила бинарной подвижной фазы, определяется, в первую очередь, природой более сильного ее компонента. В составе почти любой ПФ можно найти компонент сорбционно менее активный, выполняющий преимущественно транспортную функцию (растворитель А), и сорбционно активный, который служит для регулирования равновесия (растворитель В). Роль одного и того же компонента в различных подвижных фазах и в зависимости от характера НФ, может быть различной. Например, в ПФ гексан-хлороформ последнее соединение выступает в качестве

растворителя В (активного), а в системе хлороформ - метанол оно же играет роль растворителя А (транспортного).

С целью повышения селективности часто используют подвижные фазы более сложного состава, чем бинарные. Во многих случаях это приводит к улучшению разделения.

12.2. Растворители.

Растворители должны быть очищены от механических примесей. Примеси вызывают плохую работу клапанов, способствуют износу плунжеров и уплотнений, забивают входные фильтры колонок. Поэтому растворители нужно фильтровать через материал с порами 0,5 мкм, при отборе растворителя из резервуара тоже нужен фильтр.

Если температура кипения растворителя низкая (ниже 60^0C) - ацетон, метиленхлорид, пентан, эфир и т.д., то при всасывании могут образоваться паровые пузыри, препятствующие работе клапанов. Если растворитель составной и содержит эти вещества, то состав может меняться из-за испарения этих компонентов, будет меняться T_R. Но у менее летучих растворителей больше вязкость, что ведет к увеличению сопротивления колонки и к повышению давления на входе при сохранении расхода. Вязкость более 1,5сП не желательна.

В зависимости от метода детектирования, определенные требования предъявляются к растворителям. При УФ, работающем при 190-220нм, применимы вода, ацетонитрил, метанол, этанол, гексан, гептан, циклогексан и т.д. Поглощают обычно примеси, поэтому надо использовать не х/ч, а “для ЖХ” или “для спектроскопии”.

Конкретные растворители.

Вода. Лучше бидистиллят, еще лучше деионизованная и очищенная от органики.

Спирты. (метанол, этанол, изопропанол) - годятся и х.ч. Для ОФХ лучше метанол - у него меньше всего вязкость (0.54 сп), для НФ - изопропанол, неограниченно смешивающийся с углеводородами.

Ацетонитрил - удобен для ОФХ (низкая вязкость 0.34 сп)и хорошая растворимость.

Ароматика - поглощает в УФ и токсична.

Алканы - гексан в НФ. Недостаточно растворяет.

Элюотропный ряд - перечень растворителей в порядке возрастания элюирующей способности.

Растворитель	**Элюирующая сила на силикагеле**
Гексан	0.01
Бензол	0.10
Бутилхлорид	0.20
Хлороформ	0.26
Метиленхлорид	0.32
ИП эфир	0.34
Этилацетат	0.38
Тетрагидрофуран	0.44
Ацетонитрил	0.50
Метанол	0.70

Специфические модификаторы. Они вводятся для изменения свойств сорбента в лучшую сторону, улучшения разделения.

Уксусная кислота 0.5-2% - используется для аммоний-ацетатных буферных растворов. Поглощает ниже 230 нм.

Фосфорная кислота - в ОФХ для буферных растворов, или для создания кислой среды.

Аммиак - буферы в ОФХ и ИОХ.

Алкилсульфаты натрия (от C_2до C_{12}) - добавки для перевода в ион-парный режим, pH 2-5. Величина удерживания оснований растет.

Тетра и триалкиламмоний - ион-парный вариант определения кислот (с ростом концентрации ТБА растет удерживание анионов).

12.3. Выбор условий разделения.

Распределение молекул сорбатов между неподвижной и подвижной фазами определяется, в первую очередь, сравнительным сродством этих молекул к полярным или неполярным растворителям (или поверхностям). Это сродство является главным фактором, влияющим на величины удерживания, выбор неподвижной и подвижной фаз. Так, при использовании неполярных НФ (обращенно-фазная хроматография) удерживание ряда сорбатов уменьшается с увеличением их полярности, а удерживание данного сорбата на данной НФ уменьшается с уменьшением полярности ПФ, т.е. при добавлении органических растворителей. В противоположность этому, при хроматографии на полярных сорбентах (нормально-фазная хроматография) удерживание растет с ростом полярности сорбатов и уменьшением полярности ПФ. Т.е. "подобное притягивается подобным".

Ряд правил.

1. Адсорбционная хроматографическая система обладает удерживающей способностью только в тех случаях, когда условная полярность ПФ и НФ различается в достаточной степени. Величины удерживания тем больше, чем больше разница в полярности, химической природе фаз.

2. Приемлемые величины удерживания достигаемы только в таких случаях, когда полярность сорбата является промежуточной по сравнению с полярностью ПФ и НФ. Поэтому основной способ влияния на удерживание на данном сорбенте - изменение полярности подвижной фазы.

3. При хроматографии на силикагеле удваивание концентрации полярного компонента в ПФ ведет к уменьшению удерживания В 2-2.5 раза. При хроматографии на алкилсиликагелях (C_2, C_8, C_{18}) уменьшение концентрации растворителя в 1, 2 раза приводит к 2-2.5 кратному уменьшению удерживания сильно сорбирующихся веществ (К'>10) и 1.2-1.5 кратному уменьшению для слабо сорбирующихся (К'<2).

4. При хроматографии ионогенных соединений если pH среды такое, что допускается одновременное существование сорбата в нейтральной и ионизированных формах, степень ионизации в сорбированном и десорбированном состоянии различна. Следствие - снижение эффективности разделения, нарушение формы пика. Поэтому надо использовать ПФ на основе буферных растворов. Без этого трудно добиваться воспроизводимости и качественного разделения

В общем с понижением pH T_R оснований падет, а кислот растет.

12.4. Выбор хроматографической системы.

Под термином "тип хроматографической системы" понимают сочетание: сорбента того или иного химического класса, подвижной фазы на основании водных или органических растворителей, характеризующейся интервалом pH, наличием специфических добавок кислого, основного или поверхностно-активного характера и т.д. Выбор типа системы основывается, в первую очередь, по оценке полярности и кислотно-основных свойств компонентов изучаемой системы. Условная оценка полярности анализируемых веществ, понимаемой в данном случае как относительное количество полярных и неполярных структурных фраг-

ментов, представленных в их молекулах, может быть основана на шкале упрощенного критерия гидрофобности Н. Этот критерий рассчитывается по формуле

$$H = n_H - 4\sqrt{n_f} \qquad (20)$$

где n_H - суммарное число атомов углерода и галогенов,

n_f - число функциональных групп в молекуле сорбата.

Чем больше Н, тем меньше полярность, выше гидрофобность (водоотталкивание).

При хроматографии неполярных сорбатов средней полярности очень часто оказывается пригодными как нормально, так и обращенно-фазные системы. Для сорбатов с низкой (ароматика) или высокой (органические кислоты, спирты) полярностью, пригодны ОФХ.

Силикагель (НФХ) селективнее при разделении изомеров (о, м, п), а также сорбатов, различающихся по функциональности (производные бензола, фенола и т.д.). При разделении гомологов (пентан - декан) спиртов, кислот лучше применять алкилсиликагели (ОФХ). Если в анализируемой смеси предполагаются компоненты разной химической природы: витамины, лекарства, наркотики, токсины, гормоны начинать разработку метода лучше с ОФХ.

Карбоновые кислоты.

В ОФХ карбоновые кислоты могут существовать как в нейтральной, так и в ионизированной формах, причем соотношение этих форм в подвижной и неподвижной фазах различно. В результате пики кислот зачастую асимметричны, а величины удерживания недостаточно стабильны. Указанные осложнения легко преодолеваются, если с помощью буферного раствора или добавки кислоты поддерживать pH подвижной фазы 2-3. Такой режим иногда называют “режимом подавления ионизации”. Однако наиболее гидрофильные (муравьиная) кислоты и в этом режиме характеризуются малыми величинами удерживания, непригодными для аналитических работ.

Для таких сорбатов можно рекомендовать ионообменную либо ион-парную хроматографию. В последнем случае в качестве неподвижных фаз используют те же алкилсиликагели, а подвижная фаза помимо буферного раствора содержит гидрофобный противоион (чаще всего тетрабулиаммоний или цетилтриметиламмоний) в концентрации 0.001-0.01 моль/л. Добавка такого ион-парного агента приводит к относительному вырастанию удерживания кислот и может помимо обеспечения необходимого удерживания, служить так же средством изменения селективности процесса.

При анализе оснований преодолеть эти проблемы труднее. Метод подавления ионизации оснований неприменим, так как силикагели неустойчивы при pH>7,5. При использовании кислых буферных растворов достигается фиксация отношений протонированной и нейтральной форм оснований. Появляется возможность хроматографировать многие вещества этой группы в ОФХ режиме. Для гидрофильных оснований ($NaOH$, KOH и т.д.) во многих случаях подходит хроматография на катионитах. Однако наиболее общим приемом является ион-парная хроматография на алкилсиликагелях в водно-органических растворителях, содержащих 0,001-0,01 моль/л гидрофобного противоиона (гексил или додецилсульфата). Такой режим обеспечивает приемлемое удерживание, удовлетворительную форму пиков, позволяет варьировать селективность разделения за счет изменения концентрации ион-парного реагента.

12.5. Выбор элюирующей силы и селективности подвижной фазы.

При работе в ОФХ выбор элюирующей силы сводится к выбору концентрации органического компонента подвижной фазы. В первичном случае может быть использован подход на зависимости удерживания от Н. Если известна принадлежность сорбата к определен-

ному классу веществ и модель удерживания этого класса в ОФХ, то задача упрощается. Для такого расчета концентрации элюента есть уравнение:

$$\lg C_x = \frac{1{,}4 - (1{,}4 - \lg C)(\lg K'_x + 0{,}7)}{\lg K' + 0{,}7} \qquad (21)$$

где К'- коэффициент емкости при концентрации орг. растворителя С,

C_x - концентрация орг. растворителя, необходимая для получения желаемого K'_x.

В НФХ для наименее полярных фаз 15>Н>10 используют гексан:ИПС (95:5) или гексан:хлороформ (1:1). Для средне полярных 10>Н>5 гексан-ИПС (80:20) или хлороформ-метанол (95:5). Для полярных 5>Н>0 хлороформ метанол (80:20).

XIII. МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЭЖХ.

13.1. Подготовка растворителей.

Фильтрование . На всасывающей линии насоса необходимо помещать фильтр с большой поверхностью, чтобы его сопротивление было минимальным, иначе при всасывании возможно образование пузырей пара, что нарушает работу клапанов. Для улучшения работы насосов можно ставить сосуды с ПФ на несколько десятков см выше насосов. Чтобы продлить срок службы фильтра, нужно предварительно фильтровать все растворители через фильтр с размерами пор 2-5 микрон.

Проверка фильтра на входе насоса. Поднять сосуд над насосом на 30-40 см. К выходу насоса подсоединить капилляр $d_{внутр}$-0.3мм,l - 50 см. Растворитель должен самотеком идти через насос - 0.5 мл/мин. Меньшая скорость говорит о засорении фильтра.

Очистка фильтра. Продуть отсоединенный фильтр сжатым воздухом изнутри. Затем на 10 мин поместить в ацетон, перемешивая ацетон, потом H_2O, потом 30% HNO_3, потом H_2O. При работе в НФХ еще отмыть спиртом и 2 раза подвижной фазой.

Совместимость растворителей. Категорически запрещается использовать одновременно не полностью смешиваемые растворители (гексан-H_2O, бензол-H_2O). Допускается промывка системы растворителями, которые смешиваются между собой. Так переход с гексана на воду: гексан-чистый ИПС- ИПС с 50% воды- 80% воды. И наоборот. Особую осторожность следует проявить с буферными растворами. При их смешении с водорастворимыми органическими растворителями возможно выпадение осадков. Все узлы системы следует промывать от буферных растворов только водой. Затем можно перейти к метанолу или ацетонитрилу и далее к менее полярным орг. растворителям.

Повторное использование растворителей. Чаще всего ПФ используют однократно. Однако это не оправдано ни экономически, ни экологически. ПФ можно регенерировать-перегнать, потом снова приготовить элюент нужного состава.

Проще использовать рециркуляцию - после детектора элюент возвращается в резервуар с ПФ. При этом существенного загрязнения колонки не происходит.

а) В элюент попадают только те соединения, которые прошли колонки, т.е. сорбируются достаточно слабо. Динамического модифицирования колонки по этой же причине не происходит. Да и с точки зрения детектирования смещение базовой линии ничтожно - ведь концентрация и количество пробы очень малы. Кроме того, при рециркуляции подвижная фаза возвращается в резервуар чище, чем она там была до этого.

В случае, если подвижная фаза способна растворять сорбент, при рециркуляции этот процесс замедлен в несколько раз, и срок службы колонок будет увеличен.

Соли и буферные растворы. Ион- парные реагенты могут содержать органические соединения, поэтому их неплохо очистить пропусканием через колонку С-18. Фосфатные буферные растворы - среда для бактерий, посему их рекомендуется хранить в холодильнике. А

из неработающих колонок их надо вымыть. Нержавеющая сталь стоит почти во всех растворителях, за исключением формиатов, галогенидов и реактивов на металлы (ПАР и т.д.). Установка pH водно-органических растворов не проста. Поэтому указывают значения pH для водной части элюента, до смешения с орг. растворителем. Прибавление к водному буферному раствору органического растворителя может увеличить "кажущееся" значение pH на 1-2 единицы и он станет агрессивным к силикагелю.

13.2. Подготовка колонок.

Для того, чтобы избежать "перетягивания" уплотнений и выхода быстро их из строя, можно рекомендовать сборку всех коммуникаций прибора при включенном насосе. Каждое уплотнение затягивают постепенно в несколько приемов и только до устранения течи. Все это относится к уплотнениям типа "Svagelok". Для фторопластовых уплотнений типа "Цвет" затягивать можно до упора.

Фильтры могут засоряться на входе колонки, а если сорбент крошится , то и на выходе колонки. Для замены фильтра убирают прокладку, иглой выталкивают фильтр и ставят новый.

Стабильность сорбента в колонке. Силикагель устойчив в диапазоне pH=2-7,5. Тем не менее сорбент может "садиться", при этом нужно добавить сорбента в колонку шпателем. Увеличение сопротивления колонки может быть связано с засорением фильтров. Помогает переворот колонки. Бывает и смолообразный слой на поверхности колонки. Заменить 1-2 мм верха.

Предколонки. Можно расположить предколонку между насосом и инжектором. Она служит двум целям:

а) может сажать на себя примеси из элюента, которые могли загрязнить основную колонку (соли тяжелых металлов в ИХ),

б) если сорбент растворяется (силикагель при pH>8) то, подходя к основной колонке, он теряет свою растворяющую силу.

Предколонку можно поместить между инжектором и основной колонкой. Они защищают основную колонку от засоряющего и разрушающего действия ПФ и пробы. Они участвуют в процессе разделения, поэтому заполняются тем же сорбентом и так же тщательно.

Промывка и регенерация колонок. Для промывки используют растворители с возрастающей элюирующей силой. Объем каждого - 10 кратный объем колонки. НФ - хлороформ - этилацетат - ацетон - этанол - вода - этанол - ацетон - этилацетат - хлороформ. В ОФХ вода-метанол - хлороформ - метанол - вода - 0.1M H_2SO_4 - вода - 0.1M NH_4OH - вода. Можно проводить при t^0 40-60^{0}C. Если не поможет - колонку выбросить.

13.3. Подготовка проб.

Подготовка проб преследует цели:

-перевод образца в растворитель, совместимый с используемым элюентом;

-удаление компонентов и механических примесей, отрицательно влияющих на работу хроматографа;

-предварительное отделение таких компонентов, которые не представляют интереса либо затрудняют анализ;

-обогащение пробы определяемыми компонентами;

-перевод компонентов пробы в форму, способствующую селективному разделению, а также чувствительному и селективному детектированию.

Обычно навеску растворяют в растворителе, фильтруют. Растворитель - обычно подвижная фаза, что обеспечивает воспроизводимость результатов и форму пиков.

Нельзя использовать для растворения пробы растворители, обладающие большей элюирующей силой, чем ПФ (искажение формы пиков, осадки и т.д.).

Если $pH_{пробы}>8$, надо подкислить пробу. При анализе биологических жидкостей бывают необходимы осаждение, экстракция, фильтрация и т.д.

Часто используют патроны для концентрирования пробы. Сорбент тот же, но крупный. Пропускают много пробы, далее промывают элюентом.

Иногда необходимо получить производные для обеспечения хорошего детектирования.

13.4. Разработка и описание условий анализа.

1) Использование литературных данных по решению задачи с помощью ЖХ и другими методами. Но не всегда можно слепо воспроизвести опубликованный режим (кроме ГОСТов и стандартов). Причины: неидентичность аппаратуры, сорбентов, недоступность реактивов, растворителей и т.д., недостаточная полнота описания методик.

Часто и проблема похожа, но не те: другие примеси, концентрации, пробоподготовка. Поэтому литературные данные - это отправная точка. Повышение эффективности колонки является разумным способом улучшения разделения только для достаточно сложных смесей. Для простых и умеренно сложных смесей более правильным путем улучшения разделения является оптимизация селективности, позволяющая создавать более скоростные методики разделения. Можно последовательно соединить колонки.

1) Способ элюирования (изократа или градиент). В принципе по времени (с учетом релаксации колонки) они одинаковы, а по простоте - изократа проще.

Величины удерживания. Надо стремиться к необходимому (не избыточному) разделению за минимальное время. Оптимальное значение K'-3. При дальнейшем уменьшении концентрации сильного растворителя K' медленно растет, а разделение очень медленно улучшается. Если при K'-3 разделение плохое, то надо изменять состав ПФ или существенно улучшать эффективность колонки. При анализе примесей K' основного вещества должно быть 1. В начальной части хроматограммы обычно наблюдаются ложные пики различной природы. Поэтому при выборе состава элюента необходимо строго соблюдать следующее правило. Ни один интересующий пик не должен иметь $K'<0,2$.

Порядок таков: первоначально берут такой состав ПФ, в котором предположительные значения коэффициентов емкости будут в пределах 0,1-0,5. В этом режиме хроматографируют искусственную смесь, а затем реальный образец. Из хроматограммы искусственной смеси делают вывод, насколько надо уменьшить силу подвижной фазы, чтобы приблизиться к оптимальным значениям K'. Хроматограмма реального образца, снятая в первом режиме, позволяет выявить наличие сильносорбирующихся примесей, которые могли бы быть "потеряны" при анализе в более слабой ПФ.

Выбор несорбирующегося вещества:

В ОФХ - с УФ детектором - нитрит натрия;

с рефрактометром - вода;

В ИФ - хлороформ и гексан (в УФ и RJ).

Температура колонки. На селективность температура почти не влияет, лишь на абсолютные величины удерживания. С ростом температуры происходит некоторое снижение времен удерживания, но этого можно добиться и изменением состава ПФ. В связи с этим большинство разделений в ЖХ выполняется при комнатной температуре.

Расход подвижной фазы. Обычно 1-2 мл/мин. Если колонка набита слабо, то можно увеличить расход до 3-4 мл/мин, что почти не ухудшает разделение.

Объем и концентрация пробы. Погрешность дозирования пробы падает с ростом ее объема. Но использование разбавленных проб слишком большого объема может привести к

значительному снижению эффективности разделения, особенно при работе с колонками эффективностью 10-20 тыс. т.т.

Чтобы реализовать всю эффективность, присущую данной колонке, объем пробы не должен превышать 1/10 часть объема, соответствующего ширине хроматографического пика на половине его высоты. Чем больше диаметр колонки, тем больше предельный объем пробы. Для колонок диаметром 4,6 мм и N=10000т.т. $V_{пред}$- 25 мкл. Количество пробы не должно превышать линейного диапазона детектора. Для $\varepsilon=10^4$ и диаметра =4,6 мм предел 10-50 мкг массы компонента. Перегрузка слоя адсорбента приводит к асимметрии пика, особенно для больших К'. Это вероятно, если С>2 мг/мл.

XIV. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Химия, 1986. 288 с.
2. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. Рига: Зинатне, 1988. 220 с.
3. Сакодынский К.И., Бражников В.В. и др. Аналитическая хроматография. М.: Химия, 1993. 464 с.

СОДЕРЖАНИЕ

I. ВВЕДЕНИЕ **1**
II. ПРИНЦИПЫ И ОСНОВЫ ТЕОРИИ ХРОМАТОГРАФИИ **2**
2.1. Хроматографический процесс: удерживание, размывание, разделение....... 2
2.2. Некоторые основные термины и определения 4
2.3. Размывание хроматографических зон........ 7
III. КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ **8**
3.1. Адсорбционная хроматография 8
3.2. Ионообменная хроматография 10
3.3. Гель-проникающая хроматография 10
IV. СОРБЕНТЫ **11**
V. ОБЩАЯ СХЕМА ЖИДКОСТНОГО ХРОМАТОГРАФА **12**
VI. НАСОСЫ **14**
VII. ДОЗАТОРЫ **17**
VIII. КОЛОНКИ **18**
8.1. Устройство колонки 18
8.2. Заполнение колонок 18
IX. ДЕТЕКТОРЫ **19**
9.1. Фотометрический детектор 20
9.2. Флуориметрический детектор........ 22
9.3. Рефрактометрический детектор 23
9.4. Электрохимический детектор 23
9.5. Кондуктометрический детектор 25
X. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ **26**
XI. МЕТОДЫ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ **28**
11.1 Нормально-фазовая хроматография 28
11.2. Обращенно-фазная хроматография 29
11.3. Ионная хроматография 30
XII. ПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ **32**
12.1 Элюирующая сила и эффективность 32
12.2. Растворители 33
12.3. Выбор условий разделения 34
12.4. Выбор хроматографической системы 35
12.5. Выбор элюирующей силы и селективности подвижной фазы 36
XIII. МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЭЖХ **36**
13.1. Подготовка растворителей 36
13.2. Подготовка колонок 37

13.3. Подготовка проб 38
13.4. Разработка и описание условий анализа 38
XIV. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 40